

明 細 書

3量体以上の受容体を認識する改変抗体

技術分野

- [0001] 本発明は、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)受容体に対する抗体に関する。

背景技術

- [0002] 腫瘍壊死因子(TNF)のような或る種のサイトカインは、アポトーシスを促進させることが知られている。腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)はTNFファミリーの一員であり、癌化細胞系には死をもたらすが、ヒトの多くの正常組織には毒性を持たないように見える(特許文献1および非特許文献1参照)。現在、TRAILは5種類の受容体に対して親和性を有することが知られている。TRAILが親和性を示す受容体は、TRAIL-R1(DR4とも呼ばれる;非特許文献2参照)、TRAIL-R2(DR5、TRICK2またはkiller;非特許文献3〜5参照)、TRAIL-R3(TRID、DcR1またはLIT;非特許文献3、4、6参照)及びTRAIL-R4(TRUNDDまたはDcR2;非特許文献6および7参照)の4つの膜結合受容体、並びに可溶性受容体オステオプロテゲリン(OPG; 非特許文献8参照)の5つである。
- [0003] このうち、TRAIL-R1及びTRAIL-R2は、細胞質デスドメイン(death domain(DD))を有することが知られている。DDは、アポトーシスシグナルの伝達に関与する領域である。リガンドであるTRAILのTRAIL-R1及びTRAIL-R2への結合により、TRAIL-R1及びTRAIL-R2の3量体化が誘導され、3量体化したTRAIL-R1及びTRAIL-R2のDDにFADD/MORT-1が結合し、カスパーゼ8を誘引するアダプター分子として機能する。その結果、さらに他のカスパーゼを含む蛋白質分解カスケードが開始され、最終的にはアポトーシスによる細胞死に到る(非特許文献9参照)。TRAIL-R3及びTRAIL-R4は細胞外領域を持つものの、細胞内のシグナル伝達に関与する領域を持たないいわゆるデコイ(decoy)であり、アポトーシスシグナルの伝達は行わない。腫瘍細胞で発現されているTRAIL-R1及びTRAIL-R2とは異なり、TRAIL-R3及びTRAIL-R4は、原則的に、通常の組織において発現され、腫瘍細胞においては発現

されていない(非特許文献3〜5参照)。

- [0004] TRAIL受容体に対するモノクローナル抗体も公知である。Griffithらは、TRAIL感受性腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導する抗TRAIL-R1及びTRAIL-R2抗体、並びにTRAILによるアポトーシスを阻害する抗TRAIL-R2抗体について報告している(非特許文献10参照)。Chuntharaopaiらは、他の外来リンカーなしで腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する抗TRAIL-R1マウスモノクローナル抗体(mAb)を報告している(非特許文献11参照)。TRAIL-R1に対する抗体は、動物モデルを用いてヒトの乳癌、大腸癌、子宮癌等への治療効果が確認されており、抗癌剤としての開発が進められている。一方、TRAIL-R2に対するモノクローナル抗体としては、TRA-8が抗腫瘍活性を示すことが報告されている(非特許文献12参照)。抗TRAIL-R2抗体についても進行性腫瘍を対象とした臨床開発が進められている。

- [0005] 特許文献1:国際公開第97/01633号

非特許文献1:Wiley 著、Immunology、1995年、Vol.3、p.673-82

非特許文献2:Pan 著、Science、1997年、Vol.276、p.111-3

非特許文献3:Pan 著、Science、1997年、Vol.277、p.815-8

非特許文献4:Sheridan 著、Science、1997年、Vol.277、p.818-21

非特許文献5:Walczak 著、EMBO J.、1997年、Vol.16、p.5386-97

非特許文献6:Degli-Esposti 著、J. Exp. Med.、1997年、Vol.186、p.1165-70

非特許文献7:Marsters 著、Curr. Biol.、1997年、Vol.7、p.1003-6

非特許文献8:Emery 著、J. Biol. Chem.、1998年、Vol.273、p.14363-7

非特許文献9:Boder 著、Nat. Cell. Biol.、2000年、Vol.2、p.241-3

非特許文献10:Griffith 著、J.Immunol.、1999年、Vol.162、p.2597-605

非特許文献11:Chuntharaopai 著、J.Immunol.、2001年、Vol.166、p.4891-8

非特許文献12:Buchsbaum 著、Clin. Cancer Res.、2003年、Vol.9、p.3731-41

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、より強いアゴニスト活性を示す抗TRAIL受容体抗体を提供することを目的とする。さらに、本発明は、抗TRAIL受容体抗体に限定されず、3量体以上を形成

する受容体に対してアゴニスト活性を示す抗体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 出願人は、IgGを低分子化抗体に変換すると、変換された低分子化抗体が元のIgGよりも強いアゴニスト活性を示すことを見出した。該知見に基づき、抗TRAIL受容体抗体についても、アゴニスト活性を上昇させることを目標に、低分子化抗体の作成を試みた。TRAIL受容体は3量体として機能することが知られている。そこで、一本鎖Fv(scFv)の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)間を、2、1または0merのリンカーとすることにより3価の抗原結合部位を持つTriabody、並びに、sc(Fv)2のリンカー長を5-12-5merにすることで、4価の抗原結合部位を形成するTandem Diabodyを作製し、その活性を調べた。その結果、これらの低分子化抗体は、受容体を発現している腫瘍細胞に対して単独で顕著な細胞傷害活性を示した。TriabodyやTandem Diabodyが細胞膜表面上のTRAIL受容体の重合を促進することにより、TRAIL受容体の3量体を介したアポトーシスシグナルの伝達が促進されたものと考えられる。この結果から、同様に3量体以上で機能し、細胞死を誘導するTNF受容体、Fas受容体などのTNF受容体ファミリーに対しても、TriabodyやTandem Diabodyなどの低分子化抗体が、アゴニスト的に働き、細胞死のシグナルを伝える可能性が示唆される。

[0008] そこで、本発明はより具体的には、

- [1] TNF関連アポトーシス誘導リガンド受容体(TRAIL受容体)を認識する抗体、
- [2] 低分子化抗体である[1]に記載の抗体、
- [3] 抗原結合部位を3つ以上含むことを特徴とする[1]及び[2]に記載の抗体、
- [4] 抗原結合部位が3つである[3]に記載の抗体、
- [5] 3つのscFvが3量体を形成していることを特徴とする[4]に記載の抗体、
- [6] scFv中の2つの可変領域が0-2アミノ酸のリンカーで結合されている[5]に記載の抗体、
- [7] リンカーが0アミノ酸である[6]に記載の抗体、
- [8] リンカーが1アミノ酸である[6]に記載の抗体、
- [9] 抗原結合部位が4つである[3]に記載の抗体、
- [10] 4つの可変領域を含むポリペプチドが2量体を形成している[9]に記載の抗体

- 、
- [11] TRAIL受容体がTRAIL-R1又はTRAIL-R2である[1]〜[10]のいずれかに記載の抗体、
 - [12] 細胞にアポトーシスを誘起することを特徴とする[1]〜[11]のいずれかに記載の抗体、
 - [13] 細胞が腫瘍細胞である[12]に記載の抗体、
 - [14] 配列番号:2に記載のアミノ酸配列を有する抗体、
 - [15] 配列番号:4に記載のアミノ酸配列を有する抗体、
 - [16] 配列番号:6に記載のアミノ酸配列を有する抗体、
 - [17] 配列番号:8に記載のアミノ酸配列を有する抗体、
 - [18] 抗原結合部位を3つ以上含み、細胞にアポトーシスを誘起する抗体、
 - [19] 抗原結合部位が3つである[18]に記載の抗体、
 - [20] 抗原結合部位が4つである[18]に記載の抗体、
 - [21] 細胞が腫瘍細胞である[18]〜[20]のいずれかに記載の抗体、
 - [22] [1]〜[21]のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド、
 - [23] [22]に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ[1]〜[21]のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするポリヌクレオチド、
 - [24] [22]または[23]に記載のポリヌクレオチドを含むベクター、
 - [25] [22]または[23]に記載のポリヌクレオチドまたは[24]に記載のベクターを保持する宿主細胞、
 - [26] [1]〜[21]のいずれかに記載の抗体を含有する、医薬組成物、に関する。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]Diabodyの細胞傷害活性評価の結果を示す図である。図中、mockは空ベクターpCXND3をCOS-7に導入して測定された結果、mock+M2はmockにM2抗体を添加した結果、KMTR1 dbはDiabodyを添加した結果、そしてKMTR1 db+M2はKMTR1 dbにM2抗体を添加した結果をそれぞれ示す。

[図2]TriabodyおよびWhole IgGの細胞傷害活性評価の結果を示す図である。図中、

ScFvH5LはDiabodyを添加した細胞について測定された結果、scFvH2L、scFvH1L、およびscFvH0LはそれぞれVH-VL間のリンカー長が2 mer、1 mer及び0 merのTriabodyを添加した結果、そして、Whole IgGはWhole IgGを添加した結果をそれぞれ示す。

[図3]TriabodyとTandem Diabodyの細胞傷害活性の比較を行った結果を示す図である。図中、scFvH2L、scFvH1L、およびscFvH0はそれぞれVH-VL間のリンカー長が2 mer、1 mer及び0 merのTriabodyを添加した結果、そしてTandem DiabodyはTandem Diabodyを添加した結果を示す。

[図4]Diabody全長をコードする塩基配列の作成工程を模式的に表した図である。

[図5]図4の続きの図である。

発明を実施するための最良の形態

[0010] 以下、TRAIL受容体を例示して本発明の抗体を説明するが、本発明の抗体は、TRAIL受容体に対する抗体に限定されず、全ての3量体以上を形成する受容体に対する抗体を含む。

1. TRAIL受容体抗体

本発明によりTNF関連アポトーシス誘導リガンド受容体(TRAIL受容体)を認識する抗体が提供される。本発明のTRAIL受容体を認識する抗体は、好ましくは、TRAIL受容体を発現する細胞に細胞死(アポトーシス等)を誘起し得るものである。TRAIL受容体のうち、腫瘍細胞において発現されていることが知られているTRAIL-R1またはTRAIL-R2を認識する抗体は、本発明の抗体として好ましく、中でも、これらの受容体のいずれかが発現されている腫瘍細胞にアポトーシスを誘起するものが好ましい。本発明の抗体がアポトーシスを誘起する細胞は、好ましくは腫瘍細胞である。ここで、腫瘍細胞は特に限定されず、例えば、大腸癌、肺癌、乳癌、黒色腫、結腸直腸癌、脳腫瘍、腎細胞癌、膀胱癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、脾臓癌、胃癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌、きょう膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カポジ肉腫、血管腫、海面状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起膠腫、髓芽腫、神経芽腫

、神経膠腫、横紋筋肉腫、嚢芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状腺肉腫、ウィルムス腫瘍等の細胞を挙げることができる。

[0011] (1)TRAIL受容体

本発明において、「TRAIL受容体」とは、TNF関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)が結合する受容体であり、TRAILが結合する限りいかなる受容体であってもよい。TRAILが結合する受容体としては、現在のところ、TRAIL-1受容体、TRAIL-2受容体、TRAIL-3受容体、TRAIL-4受容体及びオステオプロテゲリン(OPG)の5種類が知られている。本発明の抗体はいかなるTRAIL受容体を認識してもよいが、好ましくはTRAIL-1受容体又はTRAIL-2受容体を認識する抗体である。それぞれのTRAIL受容体の配列は公知であり、例えば、GenBankに登録されている配列を参照することができる。本発明の抗TRAIL受容体は、好ましくは、以下のGenBank Accession番号で登録されているヒトTRAIL受容体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識するものである：TRAIL-1受容体(NP_003835)、TRAIL-2受容体(NP_003833)、TRAIL-3受容体(NP_003832)、TRAIL-4受容体(NP_003831)。

[0012] (2)抗体

本発明において、「抗体」という用語は最も広い意味で使用され、所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体変異体(キメラ抗体、ヒト化抗体、低分子化抗体(抗体断片も含む)、多特異性抗体等)が含まれる。好ましい抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、並びに、及び抗体断片等の低分子化抗体である。

[0013] 本発明のTRAIL受容体を認識するモノクローナル及びポリクローナル抗体は、天然TRAIL受容体を抗原として用いて、公知の方法により作製することができる。または、上記公知のTRAIL受容体配列に基づいて遺伝子工学的に作製された抗原性ポリペプチドを用いて作製することも可能である。モノクローナル抗体は、実質的に均質な抗体の集団であり、抗原上の単一の抗原決定基(エピトープ)に対して特異的に作用するものである。その観点から、異なるエピトープに特異性を示す複数種の抗体を含むポリクローナル抗体よりも好ましいものである。「モノクローナル抗体」という用語は、或る抗体が実質的に均一な抗体の集団の一員としての特性を示すのみで、その製

造方法等を限定するものではない。

[0014] モノクローナル抗体は例えば次の方法により得ることができる。まず、抗体取得の感作抗原として使用するTRAIL受容体タンパク質またはその抗原性ペプチドを得る。例えば、TRAIL受容体をコードする遺伝子配列のポリヌクレオチドを公知の発現ベクター中に挿入し、該発現ベクターにより適当な宿主細胞を形質転換した後、その宿主細胞中または培養上清中の目的TRAIL受容体タンパク質を公知の方法で精製する。次に、この精製TRAIL受容体タンパク質、または、該TRAIL受容体の部分ペプチドを感作抗原として使用し、公知の手法により抗体を製造する。この際、部分ペプチドはTRAIL受容体のアミノ酸配列より化学合成により得ることも可能である。さらに、TRAIL受容体を細胞表面上に発現する細胞やウイルスを感作抗原として用いることも可能である。本発明の抗TRAIL受容体抗体の認識するTRAIL受容体分子上のエピトープは特定のものに限定されず、TRAIL受容体分子上に存在するエピトープであればよい。従って、本発明の抗TRAIL受容体抗体を作製するための感作抗原は、TRAIL受容体分子上に存在するエピトープを含む断片ならば、如何なる断片も用いることが可能である。本発明の抗体を産生させるための抗原は、免疫原性を有する完全抗原でも、有さない不完全抗原(ハプテンを含む)であつてもよい。

[0015] 感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましい。一般的には、げっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、またはウサギ、サル等が使用される。

[0016] 感作抗原による動物の免疫は、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することが挙げられる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等の適当量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合、乳化した後、哺乳動物に4〜21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇しているのを確認した後に、該哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付す。

[0017] ここで、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。一方、免疫細胞と融合する親細胞としては、通常、哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。種々のミエローマ細胞株が公知であり、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123: 1548-50)、P3x63Ag8U.1 (Curr. Topics Microbiol. Immunol. (1978) 81: 1-7)、NS-1 (Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-9)、MPC-11 (Margulies et al., Cell (1976) 8: 405-15)、SP2/0 (Shulman et al., Nature (1978) 276: 269-70)、FO (deSt. Groth et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21)、S194 (Trowbridge, J. Exp. Med. (1978) 148: 313-23)、R210 (Galfre et al., Nature (1979) 277: 131-3) 等が好適に使用される。前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、例えば、ケーラーとミルステインらの方法 (Kohler and Milstein, Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) 等に準じて行うことができる。

[0018] より具体的には、例えば、細胞融合は細胞融合促進剤の存在下、通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。細胞融合に用いる培養液としては、ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液等が例示されるが、その他、この種の細胞培養に通常用いられる培養液を適宜使用することができる。さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を培養液に加えてもよい。免疫細胞を所定量のミエローマ細胞と培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液 (例えば平均分子量1000-6000程度) を通常30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって細胞融合を行い、目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) を形成させる。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。形成されたハイブリドーマは、通常、選択培養液、例えばHAT培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択することができる。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間

(通常、数日～数週間)継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施することにより、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングを行う。

[0019] また、上述のようにヒト以外の動物に抗原を免疫してハイブリドーマを得る代わりに、ヒトリンパ球をin vitroでTRAIL受容体に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、TRAIL受容体への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる(特公平1-59878号公報参照)。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるTRAIL受容体を投与して抗TRAIL受容体抗体産生細胞を取得し、これを不死化させ、TRAIL受容体に対するヒト抗体を産生するハイブリドーマを取得してもよい(国際特許出願公開番号WO 94/25585 号公報、WO 93/12227 号公報、WO92/03918 号公報、WO 94/02602 号公報参照)。

[0020] このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清としてモノクローナル抗体を得る方法がある。または、ハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、動物の腹水よりモノクローナル抗体を得る方法なども採用することができる。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

[0021] 抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込み作製されたベクターを宿主に導入する遺伝子組換え技術により、本発明の抗体を組換え型の抗体として作製することも可能である(例えば、Vandamme et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192: 767-75参照)。

具体的には、まず最初に、抗TRAIL受容体抗体を産生するハイブリドーマから、抗TRAIL受容体抗体の可変(V)領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin et al., Biochemistry (1979) 18:

5294-9)、AGPC法(Chomczynski et al., Anal. Biochem. (1987) 162: 156-9)等により全RNAを調製した後、mRNA Purification Kit (Pharmacia製)等を使用して目的のmRNAを調製することができる。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia製)を用いることによりmRNAのみを直接調製することもできる。次に、得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製)等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅は、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製)を用い、PCRを利用した5'-RACE法(Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85: 8998-9002; Belyavsky et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17: 2919-32)等により行うことができる。続いて、得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAに連結することにより組換えベクターを作製し、該組換えベクターを大腸菌等の宿主に導入し、形質転換された細胞のコロニーを選択する。得られた細胞を培養することにより所望の組換え抗体を製造する。必要に応じ、目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法等により確認する。続いて、得られた目的とする抗体のV領域をコードするDNAを所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAを含有する発現ベクターへ組み込む。発現ベクターは、発現制御領域、例えば、エンハンサー及びプロモーターを含み、該領域の制御により本発明の抗体が発現されるように抗体DNAを発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を

[0022] 抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖(H鎖)または軽鎖(L鎖)をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAが組み込まれた単一の発現ベクターで宿主細胞を形質転換してもよい(WO 94/11523 号公報参照)。

[0023] 本発明の抗体には、本発明の抗体と機能的に同等であり、かつ該抗体のアミノ酸配列と高い相同性を有する抗体も含まれる。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも50%以上の同一性、好ましくは75%以上の同一性、さらに好ましくは85%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。ポリペプチドの

相同性を決定するには、文献(Wilbur and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80: 726-30)に記載のアルゴリズムを用いることができる。このような本発明の抗体と機能的に同等であり、かつ高い相同性を有する抗体は、例えば、本発明の抗体をコードするDNAの配列情報に基づいて作製されたプローブまたはプライマーを用いたハイブリダイゼーションまたは遺伝子増幅等により得ることができる。ハイブリダイゼーションまたは遺伝子増幅を行う対象試料としては、そのような抗体を発現していることが予想される細胞より構築されたcDNAライブラリーが挙げられる。

[0024] 本明細書中、「機能的に同等」とは、対象となる抗体が本発明の抗体と同様の生物学的または生化学的活性を有することを意味する。抗体の生物学的及び生化学的活性としては、例えば、結合活性、アゴニスト活性を挙げることができる。即ち、抗体のTRAIL受容体結合活性、またはTRAIL受容体を介したアポトーシス誘導活性を測定することにより、本発明の抗体と機能的に同等であるかどうかを調べることができる。抗体の受容体を介したアポトーシス誘導活性は、これに限定されるわけではないが、例えば、実施例の「4.細胞障害活性の評価」に記載の方法に従って測定することができる。

[0025] (3)抗体の改変

本発明の抗体には、上述のようにして得られた抗体をアミノ酸の置換、欠失、付加及び／若しくは挿入、またはキメラ化やヒト化等により、そのアミノ酸配列が改変されたものが含まれる。アミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入、並びにヒト化、キメラ化などのアミノ酸配列の改変は、当業者に公知の方法により行うことが可能である。同様に、本発明の抗体を組換え抗体として作製する際に利用する抗体の可変領域及び定常領域も、アミノ酸の置換、欠失、付加及び／若しくは挿入、またはキメラ化やヒト化等によりそのアミノ酸配列を改変してもよい。

[0026] 以上のように、本発明のTRAIL受容体を認識する抗体は、TRAIL受容体への結合能を有していればいかなる抗体でもよく、由来や形状などにより限定されないが、TRAIL受容体に特異的に結合するものであることが好ましい。さらに好ましくは、TRAIL受容体を介してアポトーシスを誘導するアゴニスト抗体である。本発明の抗体はマウス抗体、ヒト抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、ラクダ抗体など、どのよう

な動物由来の抗体でもよい。さらに、例えば、キメラ抗体、中でもヒト化抗体などのアミノ酸配列を置換した改変抗体でもよい。又、各種分子を結合させた抗体修飾物、抗体断片、低分子化抗体などいかなる抗体でもよい。

[0027] (3)-1.キメラ抗体及びヒト化抗体

「キメラ抗体」とは、異なる動物由来の配列を組合わせて作製される抗体である。例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変(V)領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常(C)領域からなる抗体を例示することができる。キメラ抗体の作製は公知であり、例えば、抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることによりキメラ抗体を得ることができる。

[0028] 「ヒト化抗体」とは、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称される、ヒト以外の哺乳動物由来の抗体、例えばマウス抗体の相補性決定領域(CDR;complementarity determining region)をヒト抗体のCDRへ移植したものである。CDRを同定するための方法は公知である(Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342: 877)。また、その一般的な遺伝子組換え手法も公知である(欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576号公報参照)。そこで公知の方法により、例えば、マウス抗体のCDRを決定し、該CDRとヒト抗体のフレームワーク領域(framework region;FR)とが連結された抗体をコードするDNAを得、ヒト化抗体を通常の実験ベクターを用いた系により産生することができる。このようなDNAは、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により合成することができる(WO98/13388号公報に記載の方法を参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、CDRが良好な抗原結合部位を形成するように選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるFRのアミノ酸を改変してもよい(Sato et al., Cancer Res. (1993) 53: 851-6)。改変できるFR中のアミノ酸残基には、抗原に直接、非共有結合により結合する部分(Amit et al., Science (1986) 233: 747-53)、CDR構造に影響または作用する部分(Chothia et al., J. Mol. Biol. (1987) 196: 901-17)及

びVH-VL相互作用に関連する部分(EP239400号特許公報)が含まれる。

- [0029] 本発明の抗体がキメラ抗体またはヒト化抗体である場合には、これらの抗体のC領域は、好ましくはヒト抗体由来のものが使用される。例えばH鎖では、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4を、L鎖ではC κ 、C λ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を必要に応じ修飾してもよい。本発明のキメラ抗体は、好ましくはヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、本発明のヒト化抗体は、好ましくはヒト以外の哺乳動物由来抗体のCDRと、ヒト抗体由来のFRおよびC領域とからなる。可変領域については、(3)-3.においてまとめて説明する。ヒト抗体由来の定常領域は、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプごとに固有のアミノ酸配列を有する。本発明のヒト化抗体に用いられる定常領域は、どのアイソタイプに属する抗体の定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域が用いられるが、これに限定されるものではない。また、本発明のヒト化抗体に利用されるヒト抗体由来のFRも特に限定されず、どのアイソタイプに属する抗体のものであってもよい。

本発明のキメラ抗体及びヒト化抗体の可変領域及び定常領域は、元の抗体の結合特異性を示す限り、欠失、置換、挿入及び/または付加等により改変されていてもよい。

ヒト由来の配列を利用したキメラ抗体及びヒト化抗体は、ヒト体内における抗原性が低下しているため、治療目的などでヒトに投与する場合に有用と考えられる。

- [0030] (3)-2.低分子化抗体

本発明の抗体の好ましい態様の一つとして、低分子化抗体を挙げることができる。低分子化抗体は、体内動態の性質の面からも、大腸菌、植物細胞等を用いて低コストで製造できる点からも特に本発明の抗体として好ましいものである。

- [0031] 抗体断片は低分子化抗体の一種である。また、低分子化抗体は、抗体断片をその構造の一部とする抗体も含む。本発明の低分子化抗体は、抗原への結合能を有していれば特にその構造、製造法等は限定されない。本発明における低分子化抗体は、全長抗体と比較して、高い活性を有する。本明細書において、「抗体断片」とは、全長抗体(whole antibody、例えばwhole IgG等)の一部分であれば特に限定されないが

、重鎖可変領域(VH)又は軽鎖可変領域(VL)を含んでいることが好ましい。好ましい抗体断片の例としては、例えば、Fab、F(ab')₂、Fab'、Fvなどを挙げることができる。抗体断片中の、VHまたはVLのアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入により改変されていてもよい。さらに抗原への結合能を保持する限り、VH及びVLの一部を欠損させてもよい。例えば、前述の抗体断片のうち「Fv」は、完全な抗原認識部位と結合部位を含む最小の抗体断片である。「Fv」は、1つのVHおよび1つのVLが非共有結合により強く結合したダイマー(VH-VLダイマー)である。各可変領域の3つの相補鎖決定領域(complementarity determining region; CDR)が相互作用し、VH-VLダイマーの表面に抗原結合部位を形成する。6つのCDRが抗体に抗原結合部位を付与している。しかしながら、1つの可変領域(または、抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)であっても、全結合部位よりも親和性は低いが、抗原を認識し、結合する能力を有する。従って、このようなFvより小さい分子も本発明における抗体断片に含まれる。又、抗体断片の可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。

[0032] 低分子化抗体は、VHとVLの両方を含んでいることが好ましい。低分子化抗体の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFv等の抗体断片、並びに、抗体断片を利用して作製され得るscFv(シングルチェーンFv) (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85: 5879-83; Plickthun「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」Vol.113, Resenbourg 及び Moore編, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994))、Diabody (Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 6444-8; EP404097号; WO93/11161号; Johnson et al., Method in Enzymology (1991) 203: 88-98; Holliger et al., Protein Engineering (1996) 9: 299-305; Perisic et al., Structure (1994) 2: 1217-26; John et al., Protein Engineering (1999) 12(7): 597-604; Atwell et al., Mol.Immunol. (1996) 33: 1301-12)、sc(Fv)₂ (Hudson et al., J Immunol. Methods (1999) 231: 177-89)、Triabody (Journal of Immunological Methods (1999) 231: 177-89)、及びTandem Diabody (Cancer Research (2000) 60: 4336-41)等を挙げることができる。

[0033] 抗体断片は、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシン等のプロテアーゼにより処理して得ることができる (Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods (1992) 24:

107-17; Brennan et al., Science (1985) 229: 81参照)。また、該抗体断片のアミノ酸配列を元に、遺伝子組換えにより製造することもできる。

[0034] 抗体断片を改変した構造を有する低分子化抗体は、酵素処理若しくは遺伝子組換えにより得られた抗体断片を利用して構築することができる。又は、低分子化抗体全体をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させることもできる(例えば、Co et al., J. Immunol. (1994) 152: 2968-76; Better and Horwitz, Methods Enzymol. (1989) 178: 476-96; Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol. (1989) 178: 497-515; Lamoyi, Methods Enzymol. (1986) 121: 652-63; Rousseaux et al., Methods Enzymol. (1986) 121: 663-9; Bird and Walker, Trends Biotechnol. (1991) 9: 132-7参照)。

[0035] 抗体断片を改変した構造を有する低分子化抗体の1例であるscFvは、2つの可変領域を、必要に応じリンカー等を介して、結合させた一本鎖ポリペプチドである。scFvに含まれる2つの可変領域は、通常、1つのVHと1つのVLであるが、2つのVH又は2つのVLであってもよい。一般にscFvポリペプチドは、VH及びVLドメインの間にリンカーを含み、それにより抗原結合のために必要なVH及びVLの対部分が形成される。通常、同じ分子内でVH及びVLの間で対部分を形成させるために、一般に、VH及びVLを連結するリンカーを10アミノ酸以上の長さのペプチドリンカーとする。しかしながら、本発明におけるscFvのリンカーは、scFvの形成を妨げない限り、このようなペプチドリンカーに限定されるものではない。scFvの総説として、Pluckthun『The Pharmacology of Monoclonal Antibody』Vol.113(Rosenburg and Moore ed., Springer Verlag, NY, pp.269-315 (1994))を参照することができる。

[0036] 2分子のscFvが非共有結合によりダイマーを形成する抗体をDiabodyと呼ぶ。Diabodyは、2分子のscFvを含むことから、4つの可変領域を含み、その結果、2つの抗原結合部位を持つこととなる。ダイマーを形成させないscFvの場合と異なり、Diabodyの形成を目的とする場合、通常、各scFv分子内のVH及びVL間を結ぶリンカーは、ペプチドリンカーとする場合には、5アミノ酸前後のものとする。しかしながら、本発明におけるDiabodyを形成するscFvのリンカーは、scFvの発現を妨げず、Diabodyの形成を妨げない限り、このようなペプチドリンカーに限定されるものではない。

い。

[0037] 「sc(Fv)2」は2つのscFv等をリンカーなどで結合させて一本鎖ポリペプチドとした抗体であり、4つの可変領域を含む(Hudson et al, J. Immunol. Methods (1999) 231: 177-89)。sc(Fv)2は、全長抗体や他の低分子化抗体と比較して、特に高いアゴニスト活性を示す。通常、同一分子内で2つのVH-VL対を形成するように構築し、2つの抗原結合部位を形成するように構築する。sc(Fv)2は、例えば、scFvをリンカーで結ぶことによって作製できる。sc(Fv)2は通常、以下の構造を持つ。
[可変領域(a)]-リンカー(A)-[可変領域(b)]-リンカー(B)-[可変領域(c)]-リンカー(C)-[可変領域(d)]

[0038] リンカーとしてどのようなリンカーを用いてもよい。例えば、ペプチドリンカー、合成化合物リンカー(Protein Engineering (1996) 9(3): 299-305参照)等が挙げられるが、好ましくはペプチドリンカーを用いる。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能である。本発明の低分子化抗体に使用されるリンカーについては、下記(3)-2-3.において詳述する。また、可変領域も特に限定されず、2つのVHと2つのVLを有していればよい。特に好ましい例として、可変領域(a)及び可変領域(c)をVH、可変領域(b)及び可変領域(d)をVLとし、可変領域(a)及び(d)、そして可変領域(b)及び(c)が各々対形成して2つの抗原結合部位を同一ペプチド鎖上で形成するよう、リンカー(A)及び(C)は短く、そしてリンカー(B)は十分に長い構成とする。

[0039] 本発明の抗体の好ましい態様の一つとして、抗原結合部位を3つ以上含む抗体を挙げることができる。結合部位の数の上限は特に限定されないが、通常、30以内(10以内、5以内など)である。本発明において好ましい抗体は、抗原結合部位を3つ又は4つ含む抗体である。1つの抗原結合部位は、通常、1つの重鎖可変領域(VH)と1つの軽鎖可変領域(VL)の対で構成される。従って、通常、抗原結合部位を3つ含む抗体には、3つのVHと3つのVLが含まれ、抗原結合部位を4つ含む抗体には、4つのVHと4つのVLが含まれる。

[0040] 本発明の抗原結合部位を3つ含む抗体は、特にその形状により限定されず、抗原結合部位を3つ含む限りいかなる抗体であってもよい。好ましい例として、scFvの3量

体(triabody)を挙げることができる。一方、本発明の抗原結合部位を4つ含む抗体も、特にその形状などにより限定されず、抗体が抗原結合部位を4つ含む限りいかなる抗体であってもよい。好ましい例として、2つのsc(Fv)₂の2量体(Tandem Diabody) (Cancer Research (2000) 60: 4336-41)を挙げることができる。

[0041] (3)-2-1.Triabody

scFvの3量体(triabody)を形成する場合、scFv同士を非共有結合により3量体として形成しても、共有結合により3量体として形成してもよい。又、非共有結合と共有結合の両方を1つの分子中で混在させる形で3量体を形成していてもよい。

[0042] 2つの可変領域の結合は間にリンカーなどを介してもよいし、リンカーを介さずに直接2つの可変領域を結合させてもよい。リンカーはどのようなリンカーを用いてもよく、例えば、ペプチドリンカーや合成化合物リンカーを用いることができるが、好ましくはペプチドリンカーが用いられる。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することができる。しかしながら、ペプチドリンカーの長さを0〜2アミノ酸にすることによりtriabodyを形成することが可能であることが知られていることから(Journal of Immunological Methods (1999) 231: 177-89)、triabodyを作製する場合には可変領域間のペプチドリンカーを0〜2アミノ酸にすることが好ましく、特に0又は1アミノ酸とすることが好ましい。本発明において、0アミノ酸のペプチドリンカーとは、ペプチドリンカーを介していないことを示し、従って、2つの可変領域が直接結合されていることを示す。

[0043] 本発明のtriabodyを作製する際には、3つのscFvをリンカーなどで結合して、一本鎖ポリペプチドとしてもよい。この場合、一本鎖ポリペプチド中に6つの可変領域が含まれることとなる。この場合、scFv間のペプチドリンカーは十分に長いペプチドリンカーであることが好ましい。以上のようにして作製された抗体がtriabodyであるか否かは、精製ポリペプチドをゲルろ過クロマトグラフィーなどで分離し、3量体に相当する分子量の位置に精製ポリペプチドのピークを検出することで判断できる。なお、本発明においてゲルろ過クロマトグラフィーに用いる担体としてはSuperdex 200あるいはSuperose 6などが挙げられる。

[0044] その他、抗原結合部位を3つ含む抗体の例としては、例えば、3つの可変領域を含

む一本鎖ポリペプチドの2量体を挙げるができる。この場合、通常、一方の一本鎖ポリペプチドには2つの重鎖可変領域(VH)と1つの軽鎖可変領域(VL)が含まれ、他方の一本鎖ポリペプチドには2つのVLと1つのVHが含まれる。又、一方の一本鎖ポリペプチドに3つの重鎖可変領域(VH)を含み、他方の一本鎖ポリペプチドに3つの軽鎖可変領域が含まれていてもよい。

[0045] (3)-2-2. Tandem Diabody

「sc(Fv)2」は2つのscFv等をリンカーなどで結合させて一本鎖ポリペプチドとした抗体であり、4つの可変領域を含む。従って、sc(Fv)2の2量体であるTandem Diabodyは、8つの可変領域を含む。Tandem Diabodyを構成するsc(Fv)2は、通常、以下の構造を持つ。

[可変領域]-リンカー(1)-[可変領域]-リンカー(2)-[可変領域]-リンカー(3)-[可変領域]

[0046] 通常、Tandem Diabodyに含まれる8つの可変領域のうち4つがVHであり、4つがVLである。Tandem Diabodyを構成するsc(Fv)2の可変領域は、2分子のsc(Fv)2が組合わされた場合に、4つのVH及び4つのVLを有するようになればよく、一方の分子中の可変領域は、0〜4個のVHにより構成され得る(残りの可変領域はVLとする)。その場合のVHとVLの順序は特に限定されず、どのような順序で並べられていてもよい。従って、Tandem Diabodyは、(1)2つのVHと2つのVLを含む2個のsc(Fv)2、(2)4つのVHをもつsc(Fv)2、及び4つのVLをもつsc(Fv)2、または(3)3つのVHと1つのVLを持つsc(Fv)2、及び3つのVLと1つのVHを持つsc(Fv)2により構成され得る。本発明のTandem Diabodyには、それら全てのTandem Diabodyが含まれる。可変領域を結ぶリンカーとしてはどのようなリンカーを用いてもよい。例えば、ペプチドリンカー、合成化合物リンカー等が挙げられるが、好ましくはペプチドリンカーを用いる。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能である。Tandem Diabodyを形成する為には、リンカー(1)とリンカー(3)を短いペプチドリンカーとすることが好ましく、例えば、0〜10アミノ酸、好ましくは2〜8アミノ酸、さらに好ましくは4〜6アミノ酸(例えば5アミノ酸)のリンカーとする。一方、リンカー(2)は長いペプチドリンカーとすることが好ましく、例えば、10〜30アミノ酸、好ましくは12〜20アミノ酸、

さらに好ましくは14〜16アミノ酸(例えば15アミノ酸)とする。

本発明のTandem Diabodyを作製する際には、2つのsc(Fv)₂をリンカーなどで結合して、一本鎖Tandem Diabodyとしてもよい。この場合、一本鎖ポリペプチドには、8つの可変領域が含まれる。

[0047] 以上のようにして作製された抗体がTandem Diabodyであるか否かは、精製ポリペプチドをゲルろ過クロマトグラフィーなどで分離し、2量体に相当する分子量の位置に精製ポリペプチドのピークを検出することで判断できる。なお、本発明においてゲルろ過クロマトグラフィーに用いる担体としてはSuperdex 200あるいはSuperose 6などが挙げられる。

その他、抗原結合部位を4つ含む抗体の例としては、例えば、scFvの4量体などを挙げることができる。これら全ての抗体が、本発明の抗原結合部位が4つの抗体に含まれる。

[0048] 以上、本発明の抗体の好ましい態様として、抗原結合部位が3つ又は4つの抗体の例を挙げたが、同じ原理を用いて、抗原結合部位が5つ以上の抗体を作製することも可能である。

[0049] (3)-2-3.リンカー

本発明において、低分子化抗体のリンカーにはどのようなリンカーを用いてもよく、例えば、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー(例えば、Protein Engineering (1996) 9(3): 299-305参照)を用いることができる。

本発明において使用できるペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能である。通常、scFVのペプチドリンカーとしては、1〜100アミノ酸、好ましくは5〜30アミノ酸、特に好ましくは12〜18アミノ酸(例えば、15アミノ酸)が用いられる。本発明におけるペプチドリンカーを構成するアミノ酸配列としては、例えば、以下のような配列を挙げることができる:

Ser

Gly•Ser

Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly

Gly•Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly•Gly

Gly•Gly•Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly

Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly

Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly

(Gly•Gly•Gly•Gly•Ser)_n

(Ser•Gly•Gly•Gly•Gly)_n

Ala•Ala•Asp•Ala•Ala•Ala•Ala•Gly•Gly•Pro•Gly•Ser

[nは1以上の整数である]

[0050] 本発明の抗体に用いることができる合成化学物リンカー(化学架橋剤)は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)ジスクシンイミジルスベレート(DSS)、ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS³)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(DSP)、ジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオネート)(DTSSP)、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)(EGS)、エチレングリコールビス(スルホスクシンイミジルスクシネート)(スルホ-EGS)、ジスクシンイミジル酒石酸塩(DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩(スルホ-DST)、ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、ビス[2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(スルホ-BSOCOES)などであり、これらの架橋剤は市販されている。

[0051] 4つの抗体可変領域をリンカーにより結合する場合には、通常、3つのリンカーが必要となるが、全て同じリンカーを用いてもよいし、異なるリンカーを用いてもよい。また、場合によってはリンカーを介さずに可変領域同士を連結してもよい。

[0052] (3)-3.抗TRAIL受容体抗体の可変領域

本発明のキメラ抗体、ヒト化抗体及び低分子化抗体の作製において利用できる抗TRAIL受容体抗体の可変領域は、当業者に公知の方法により得ることができる。例え

ば、既に公知の抗体(例えば、WO02/94880に記載の抗体など)の可変領域を用いることが可能である。又、TRAIL受容体又はその断片を免疫原として当業者に公知の方法で抗体を作製し、その可変領域を用いることもできる。公知の抗体、または公知の方法により得られた抗体の可変領域の配列を解読し、遺伝子工学的手法に作製された可変領域を利用することも可能である。可変領域、及び可変領域中のCDRの由来は特に限定されず、どのような動物由来でもよい。例えば、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ラクダ抗体などの配列を用いることが可能である。

[0053] さらに可変領域(例えば、FR部分)のアミノ酸を改変してもよい。アミノ酸の改変には、アミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入が含まれ、これらのアミノ酸改変操作は、当業者に公知の方法により行うことが可能である。具体的には、部位特異的変異誘発法(Hashimoto-Gotoh et al., *Gene* (1995) 152: 271-5; Zoller and Smith, *Methods Enzymol.* (1983) 100: 468-500; Kramer et al., *Nucleic Acids Res.* (1984) 12: 9441-56; Kramer and Fritz, *Methods Enzymol.* (1987) 154: 350-67; Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82: 488-92; Kunkel, *Methods Enzymol.* (1988) 85: 2763-6)などの手法を用いることができる。

[0054] 抗体においてアミノ酸残基を変異させる場合、元のアミノ酸残基の側鎖と同等な性質を有する別のアミノ酸に変異させることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質に基づいてアミノ酸を分類すると:疎水性アミノ酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸(G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S, T, Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C, M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D, N, E, Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R, K, H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H, F, Y, W)に分類することができる(括弧内はいずれもアミノ酸の一字標記を表す)。このような分類に基づいて、同等な性質を有する側鎖を選択することができる。あるポリペプチドのアミノ酸配列のうち1又は複数個のアミノ酸残基が、欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドが、元となったポリペプチドの生物学的活性を維持していることはすでに知られている(Mark et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) 81: 5662-6; Zoller and Smith, *Nucleic Acids*

Res. (1982) 10: 6487-500; Wang et al., Science (1984) 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79: 6409-13)。そこで、本発明の抗体に適宜変異を導入することにより、該抗体と同等な結合特異性を有する機能的に同等、または場合によっては安定性、結合親和性等が改善された抗体を調製することができる。

[0055] 本発明者らは、一般的に、抗体の改変前と改変後ではアゴニスト活性に差があることを見出した。即ち、改変前にアゴニスト活性を有していない抗体でも、低分子化などの改変によりアゴニスト活性を示す場合がある。そこで、本発明の改変された抗体の設計にあたっては、元々はアゴニスト活性を有していないがTRAIL受容体に結合する抗体の可変領域を用い、アゴニスト活性を示す改変抗体を作製してもよい。

[0056] 本発明の好ましい態様の一つとして、以下のいずれかに記載のアミノ酸配列を有する低分子化抗体を挙げることができる。

(1)配列番号:2に記載のアミノ酸配列

(2)配列番号:4に記載のアミノ酸配列

(3)配列番号:6に記載のアミノ酸配列

(4)配列番号:8に記載のアミノ酸配列

(1)ー(3)に記載の抗体は、好ましくは配列番号:2、4、あるいは6に記載のアミノ酸配列を有する抗体(それぞれScFvH2L、ScFvH1L、およびScFvH0L)、またはその多量体であり、より好ましくは配列番号:2、4、あるいは6に記載のアミノ酸配列を有する抗体の3量体(Triabody)である。

(4)に記載の抗体は、好ましくは配列番号:8に記載のアミノ酸配列を有する抗体(pCXND3/KMTR1 Tandabにコードされる抗体)またはその多量体であり、より好ましくは配列番号:8に記載のアミノ酸配列を有する抗体の2量体(Tandem Diabody)である。

なお、ScFvH2Lをコードする塩基配列を配列番号:1に、ScFvH1Lをコードする塩基配列を配列番号:3に、ScFvH0Lをコードする塩基配列を配列番号:5に、pCXND3/KMTR1 Tandabをコードする塩基配列を配列番号:7に示す。

[0057] 本発明は、また、上記配列を有する抗体と機能的に同等な抗体を包含する。このよ

うな抗体には、例えば、これら抗体の変異体等が含まれる。

機能的に同等な抗体を調製するための具体的な方法として、上記抗体の可変領域（例えば、FR部分）のアミノ酸を改変する方法が挙げられる。アミノ酸の改変には、アミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入が含まれ、これらのアミノ酸改変操作は、当業者に公知の方法により行うことが可能である。具体的には、部位特異的変異誘発法（Hashimoto-Gotoh et al., *Gene* (1995) 152: 271-5; Zoller and Smith, *Methods Enzymol.* (1983) 100: 468-500; Kramer et al., *Nucleic Acids Res.* (1984) 12: 9441-56; Kramer and Fritz, *Methods Enzymol.* (1987) 154: 350-67; Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82: 488-92; Kunkel, *Methods Enzymol.* (1988) 85: 2763-6)などの手法を用いることができる。

[0058] 抗体の可変領域においてアミノ酸残基を変異させる場合、元のアミノ酸残基の側鎖と同等な性質を有する別のアミノ酸に変異させることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質に基づいてアミノ酸を分類すると：疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G、A、V、L、I、P）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S、T、Y）、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C、M）、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D、N、E、Q）、塩基含有側鎖を有するアミノ酸（R、K、H）、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H、F、Y、W）に分類することができる（括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す）。このような分類に基づいて、同等な性質を有する側鎖を選択することができる。あるポリペプチドのアミノ酸配列のうち1又は複数個のアミノ酸残基が、欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドが、元となったポリペプチドの生物学的活性を維持していることはすでに知られている（Mark et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) 81: 5662-6 ; Zoller and Smith, *Nucleic Acids Res.* (1982) 10: 6487-500; Wang et al., *Science* (1984) 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982) 79: 6409-13)。そこで、本発明の抗体に適宜変異を導入することにより、該抗体と同等な結合特異性を有する機能的に同等、または場合によっては安定性、結合親和性等が改善された抗体を調製することができる。

[0059] 本発明の抗体のアミノ酸配列に複数個のアミノ酸残基が付加された抗体には、これら抗体と他のポリペプチドとが融合された融合タンパク質が含まれる。融合タンパク質を作製する方法は、本発明の抗体をコードするDNAと他のペプチド又はタンパク質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明の抗体との融合に付される他のペプチド又はタンパク質としては、例えば、FLAG (Hopp et al., Bio/Technology (1988) 6: 1204-10)、6個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 α -tubulinの断片、B-tag、Protein C の断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明の抗体との融合に付される他のタンパク質としては、例えば、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合タンパク質) 等が挙げられる。市販されているこれらペプチドまたはタンパク質をコードするDNAを、本発明の抗体をコードするDNAと融合させ、これにより調製された融合DNAを発現させることにより、融合タンパク質を調製することができる。上記各配列を有するTriabody、及びTandem Diabodyは、Flagタグが付加されているので、このFlagタグ部分を除き、他のペプチドまたは蛋白質と融合することも可能である。

[0060] 2. 抗原結合部位を3つ以上含む、アポトーシスを誘起する抗体

本発明において、出願人は、TRAIL受容体がin vivoにおいて、3量体として機能している点に着目した。まず、一本鎖Fv(scFv)のVH及びVL間を、2、1または0merのリンカーとすることにより3価の抗原結合部位を持つTriabody、並びに、sc(Fv)2のリンカー長を5-12-5merにすることで、4価の抗原結合部位を形成するTandem Diabodyを作製し、その活性を調べた。その結果、これらの低分子化抗体は受容体を発現している腫瘍細胞に対して、単独で顕著な細胞傷害活性を示した。Triabody やTandem Diabodyが細胞膜表面上のTRAIL受容体の重合を促進することにより、TRAIL受容体の3量体を介したアポトーシスシグナルの伝達が促進されたものと考えられる。この結果から、同様に3量体で機能し、細胞死を誘導するTNF受容体、Fas受容体などの

TNF受容体ファミリーに対しても、Triabody やTandem Diabodyなどの抗原結合部位を3つ以上持つ低分子化抗体が、アゴニスト的に働き、細胞死のシグナルをより効率的に伝えるものと考えられた。

[0061] そこで、本発明は、抗原結合部位を3つ以上含む、細胞にアポトーシスを誘起する抗体を提供するものである。当該抗体は好ましくは、抗原結合部位を3つ以上含む、細胞にアポトーシスを誘起する低分子化抗体である。また、好ましくはTriabody等、抗原結合部位を3つ持つ抗体である。または、好ましくは、Tandem Diabody等の抗原結合部位を4つ持つ抗体である。

[0062] 本発明の抗体がアポトーシスを誘起する細胞は好ましくは腫瘍細胞である。腫瘍細胞は特に限定されず、例えば、大腸癌、肺癌、乳癌、黒色腫、結腸直腸癌、脳腫瘍、腎細胞癌、膀胱癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、膵臓癌、胃癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌、きょう膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カポジ肉腫、血管腫、海面状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起膠腫、髄芽腫、神経芽腫、神経膠腫、横紋筋肉腫、膠芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状肉腫、ウィルムス腫瘍等由来の細胞を挙げることができる。

[0063] 上記1.の(3)-2.においてTRAIL受容体に対する低分子化抗体について述べたが、同様の手法により、TNF受容体ファミリーの他の受容体、例えばTNF受容体、Fas受容体等に対する低分子化抗体を作成することができる。

[0064] 3. 抗体をコードするポリヌクレオチド

本発明により、上記1.及び2.の抗体をコードするポリヌクレオチドも提供される。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体をコードする限り、特に限定されず、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体である。天然以外の塩基を含んでもよい。

[0065] 本発明のポリヌクレオチドは、抗体を遺伝子工学的手法により発現させる際に使用することができる。また、本発明の抗体と同等な機能を有する抗体をスクリーニングする際に、プローブとして用いることもできる。即ち、本発明の抗体をコードするポリヌク

レオチド、またはその一部をプローブとして用い、ハイブリダイゼーション、遺伝子増幅技術(例えば、PCR)等の技術により、該ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするDNAを得ることができる。このようなDNAも、本発明のポリヌクレオチドに含まれる。ハイブリダイゼーション技術(Sambrook et al., Molecular Cloning 2nd ed.(1989) 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press)は当業者によく知られた技術である。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントな条件では、ハイブリダイゼーション後の洗浄を例えば、42℃、0.1×SSC、0.1%SDSの条件、好ましくは50℃、0.1×SSC、0.1%SDSの条件で行う。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件では例えば、65℃、5×SSC及び0.1%SDSの条件で洗浄を行う。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度、塩濃度の他にも複数の要素が考えられるが、当業者であればこれら要素を考慮し、適当な条件を設定することで上記条件と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

[0066] これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により得られるDNAがコードする、本発明の抗体と機能的に同等な抗体は、通常、本発明の抗体とアミノ酸配列において高い相同性を有する。

[0067] 4. ベクター

本発明は、さらに、上記3.のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

本発明のベクターは、本発明のポリヌクレオチドが組み込まれている限りどのようなベクターであつてもよく、特に限定されない。例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌(例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue)などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌での選抜を可能とする遺伝子(例えば、なんらかの薬剤(アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等)による判別を可能にする薬剤耐性遺伝子)を有することが好ましい。このようなベクターの例としては、M13系ベクタ

一、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。

[0068] 本発明のベクターとしては、特に、発現ベクターが有用である。例えば、大腸菌での本発明の抗体の発現を目的とする発現ベクターの場合、ベクターの増幅を可能にする上記構成に加えて、効率よい抗体の発現を可能にするプロモーターを持つ必要がある。例えば、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合には、lacZプロモーター(Ward et al., Nature (1989) 341: 544-6; FASEB J. (1992) 6: 2422-7)、araBプロモーター(Better et al., Science (1988) 240: 1041-3)、及びT7プロモーターなどが例示される。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1(Pharmacia製)、「QIAexpress system」(Qiagen製)、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。

[0069] また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。蛋白質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列(Lei et al., J. Bacteriol. (1987) 169: 4379)を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、塩化カルシウム法またはエレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

[0070] 本発明のベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター(pcDNA3 (Invitrogen製)、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. (1990) 18(17): 5322)、pEF、pCDM8等)、昆虫細胞由来の発現ベクター(「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL製)、pBacPAK8等)、植物由来の発現ベクター(pMH1、pMH2等)、動物ウイルス由来の発現ベクター(pHSV、pMV、pAdexLcw等)、レトロウイルス由来の発現ベクター(pZIPneo等)、酵母由来の発現ベクター(「Pichia Expression Kit」(Invitrogen製)、pNV11、SP-Q01等)、枯草菌由来の発現ベクター(pPL608、pKTH50等)も使用することができる。

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーターとして、例えばSV40プロモーター(

Mulligan et al., Nature (1979) 277: 108)、MMLVLTRプロモーター、EF1 α プロモーター (Mizushima et al., Nucleic Acids Res. (1990) 18: 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠である。さらに、細胞がベクターにより形質転換されたかどうかを判定するための遺伝子 (例えば、薬剤 (ネオマイシン、G418など) により判別できるような薬剤耐性遺伝子) を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13が挙げられる。

- [0071] さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、例えば、核酸合成経路を欠損したCHO細胞に、その欠損を補うジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子を有するベクター (pCHOIなど) を導入し、DHFRの拮抗阻害を行うメトトレキサート(MTX) 存在下でインキュベートすることによりベクターを増幅させることができる。また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター (pcDなど) で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス(BPV) 等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

[0072] 5. 宿主細胞及び宿主、並びにそれらを用いた抗体産生

本発明により、上記3.のポリヌクレオチドまたは上記4.のベクターを保持する宿主細胞が提供される。ここで、宿主細胞は、特に制限されず、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを挙げることができる。宿主細胞は、例えば、本発明の抗体の製造や発現のための産生系として使用することができる。ポリペプチド製造のための産生系には、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系及び原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

- [0073] 宿主細胞として使用できる真核細胞として、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細

胞が挙げられる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108: 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero 等、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle et al., Nature (1981) 291: 338-340)、及び昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が例示される。本発明の抗体の発現においては、CHO-DG44、CHO-DX11B、COS7細胞、BHK細胞が好適に用いられる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP (Boehringer Mannheim製)を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

- [0074] 植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が蛋白質生産系として知られており、この細胞をカルス培養する方法により本発明の抗体を産生させることができる。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属の細胞 (サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ポンベ (*Saccharomyces pombe*) 等)、及び糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属の細胞 (アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 等)を用いた蛋白質発現系が公知であり、本発明の抗体産生の宿主として利用できる。
- [0075] 原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、上述の大腸菌 (*E. coli*)に加えて、枯草菌を用いた産生系が知られており、本発明の抗体産生に利用できる。
- [0076] 本発明の宿主細胞を用いて抗体を産生する場合、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターにより形質転換された宿主細胞の培養を行い、ポリヌクレオチドを発現させればよい。培養は、公知の方法に従って行うことができる。例えば、動物細胞を宿主とした場合、培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、FBS、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用しても、無血清培養により細胞を培養してもよい。培養時のpHは、約6〜8とするのが好ましい。培養は、通常、約30〜40℃で約15〜200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。
- [0077] 一方、in vivoでポリペプチドを産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生

系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするポリヌクレオチドを導入し、動物又は植物の体内でポリペプチドを産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

- [0078] 動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシ等を用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications (1993))。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

例えば、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むポリヌクレオチド断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的の抗体を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生される抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに投与してもよい (Ebert et al., Bio/Technology (1994) 12: 699-702)。

- [0079] また、本発明の抗体を産生させる昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的の抗体をコードするポリヌクレオチドを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的の抗体を得ることができる (Susumu et al., Nature (1985) 315: 592-4)。

- [0080] さらに、植物を本発明の抗体産生に使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とする抗体をコードするポリヌクレオチドを植物発現用ベクター、例えば pMON 530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得ることができる (Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24: 131-8)。

- [0081] このようにして得られた抗体は、宿主細胞内または細胞外 (培地、乳汁など) から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何

ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組合わせて抗体を分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al.(1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia製)等が挙げられる。

[0082] 必要に応じ、抗体の精製前又は精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

[0083] 本発明で開示されている抗体(例えば、低分子化抗体や抗原結合部位を3つ以上有する抗体、など)が認識する抗原は、TRAIL受容体のみならず、他の3量体以上の受容体であってもよい。従って、本発明には、抗TRAIL受容体抗体のみならず、他の3量体以上の受容体に対する抗体も含まれる。

[0084] 他の3量体以上の受容体は特に限定されず、いかなる受容体であってもよいが、例えばTNF Familyの受容体を挙げることができる。TNF Familyの受容体としては、p55-R, CD120a, TNF-R-I p55, TNF-R, TNFR1, TNFAR, TNF-R55, p55TNFR, TNFR60, CD120b, p75, TNF-R, TNF-R-II, TNFR80, TNFR2, TNF-R75, TNFBR, p75TNFR, TNFRSF3, TNFR2-RP, CD18, TNFR-RP, TNFCR, TNF-R-III, OX40, ACT35, TXGP1L, p50, Bp50, CD40, FAS, CD95, APO-1, APT1, DcR3, M68, TR6, HGNC:15888, NHL, DKFZP434C013, KIAA1088, bK3184A7.3, C20orf41, Tp55,

S152, CD27, Ki-1, D1S166E, CD30, 4-1BB, CD137, ILA, DR4, Apo2, TRAILR-1, DR5, KILLER, TRICK2A, TRAIL-R2, TRICKB, DcR1, TRAILR3, LIT, TRID, DcR2, TRUNDD, TRAILR4, RANK, OPG, OCIF, TR1, DR3, TRAMP, WSL-1, LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3, DR3L, TACI, BAFFR, HVEM, ATAR, TR2, LIGHTR, HVEA, TNFRSF16, p75NTR, BCMA, TNFRSF13, AITR, GITR, TAJ-alpha, TROY, TAJ, TRADE, FLJ14993, RELT, DR6, SOBa, Tnfrh2, 2810028K06Rik, mSOB, Tnfrh1などを挙げることができる。(これらTNF Familyの受容体は、HUGO Gene Nomenclature Committeeにおいては、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B、lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, activator of NFkB、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12-like、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13C、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)、nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19-like、tumor necrosis factor receptor superfamily,

member 21、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 22、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 23、等の名称で認証されている。)

[0085] 従って本発明は、TNF Family受容体等の、3量体以上の受容体に対する抗体を含む。TRAIL受容体以外の3量体以上の受容体に対する抗体についても、抗TRAIL受容体抗体と同様に、低分子化抗体や3つ以上の抗原結合部位を有する抗体(例えば、TriabodyやTandem Diabodyなど)であることが好ましい。

これらの受容体は3量体以上であれば特に限定されず、例えば、4量体、5量体、6量体、7量体などを挙げることができるが、好ましくは3量体又は4量体であり、特に好ましくは3量体である。

[0086] 6. 医薬組成物

本発明は、上記1.または2.に記載の抗体を含む医薬組成物を提供する。抗体が、細胞にアポトーシスを誘起する抗体である場合には(例えば、抗TRAIL受容体抗体である場合には)、該抗体を含有する医薬組成物は、特に抗癌剤として有用である。例えば、大腸癌、肺癌、乳癌、黒色腫、結腸直腸癌、脳腫瘍、腎細胞癌、膀胱癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、膵臓癌、胃癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌、きょう膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カポジ肉腫、血管腫、海面状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起膠腫、髄芽腫、神経芽腫、神経膠腫、横紋筋肉腫、膠芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状腺肉腫、ウィルムス腫瘍等において、腫瘍細胞のアポトーシスを誘起することにより抗癌活性を示すことが期待される。

[0087] 又、TNF Family受容体は、Crohn病、Behcet病などの炎症性疾患(TNFR)や慢性関節リウマチ(TNFR)、全身性エリトマトーデス(BAFFR)などの自己免疫疾患等に関与していることが知られているので、例えば、抗体が抗TNF Family受容体抗体である場合には、該抗体を含有する医薬組成物は、炎症性疾患や自己免疫疾患等の治療・予防に有用である。

[0088] 本発明の抗体を医薬組成物に用いる場合には、当業者に公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌

性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は、指示された範囲の適当な容量が得られるように設定する。

[0089] 注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬(例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム)を含む等張液が挙げられる。適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80(TM)、HCO-50等)を併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル及び/またはベンジルアルコールを併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液及び酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩酸プロカイン)、安定剤(例えば、ベンジルアルコール及びフェノール)、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填する。

[0090] 本発明の医薬組成物は、好ましくは非経口投与により投与される。例えば、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型の組成物とすることができる。例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。

投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択することができる。抗体または抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する医薬組成物の投与量は、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲に設定することが可能である。または、例えば、患者あたり0.001〜100000mgの投与量とすることもできるが、本発明はこれらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量及び投与方法は、患者の体重、年齢、症状などにより変動するが、当業者であればそれらの条件を考慮し適当な投

与量及び投与方法を設定することが可能である。

- [0091] また、必要に応じ本発明の抗体を、その他の医薬成分と組合わせて製剤化することもできる。例えば、複数種のTRAIL受容体に対する抗体を組合わせて医薬組成物とすることができる。また、化学療法、及び／または放射線療法を組合わせて行うことにより抗腫瘍活性が増幅される抗TRAIL-R2抗体も知られていることから(Buchsbaum et al., Clin. Cancer Res.(2003) 9: 3731-41)、本発明の抗体を含む医薬組成物による治療も、化学療法及び放射線療法と組合わせて行ってもよい。化学療法に使用される医薬成分としては、例えば、塩酸ドキソルビシン製剤、パクリタキセル等が挙げられる。本発明の抗体と組合わせて使用される医薬成分は、抗体及び医薬成分の活性が阻害されず、同じ投与経路により投与されるものであれば組合わせて1つの医薬製剤とすることも可能である。

さらに本発明は、本発明の抗体を用いることにより、細胞の細胞死を誘導する方法に関する。具体的には、本発明の抗体を細胞に接触させることにより、該細胞に細胞死を誘導する方法に関する。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

- [0092] 以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれら実施例により制限されるものではない。

1. Diabody、Triabody、Tandem diabodyおよびWhole IgG発現ベクターの構築

1-1. Diabody発現ベクターの構築

抗体の細胞障害性活性を評価するDiabody抗体として、特許(WO 02/094880 A1)に記載の塩基配列に基づいて可変領域配列を決定したKMTR1抗体を作製した。

重鎖可変領域としては、WO 02/094880 A1中、配列番号:32の塩基配列81番目のアデニン(A)から497番目のアデニン(A)までの配列を採用した。これには重鎖シグナル配列が含まれる。軽鎖可変領域としては、WO 02/094880 A1中、配列番号:34の塩基配列123番目のグアニン(G)から443番目のアデニン(A)までの配列を採用した。これは、シグナル配列を含まない成熟体の配列である。

[0093] 抗体断片をコードする遺伝子断片は、以下の様にデザインした。発現ベクター pCXND3へ挿入するために、該遺伝子断片の5'末端および3'末端はそれぞれ制限酵素EcoRIおよびNotI認識配列が付加されている。EcoRI認識配列に続いてKozakコンセンサス配列CCACC、続いてシグナル配列を含む重鎖可変領域配列 (Heavy Chain Variable Region; VH)、さらにGly-Gly-Gly-Gly-Ser (配列番号: 10) からなる5merのリンカー配列が付加されている。このリンカーをコードするDNA配列は5'-GGT GGA GGC GGA TCG -3' (配列番号: 9) である。これに続いてシグナル配列を含まない軽鎖可変領域配列 (Light Chain Variable Region; VL) が連結し、さらにエピトープタグFlag (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys / 配列番号: 12) の配列が付加されている。Flagをコードする塩基配列は5'-GAC TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG -3' (配列番号: 11) である。そしてストップコドンで2回連結し、最後にNotI認識配列が付加されている。デザインされたDiabodyをコードする塩基配列を配列番号: 13に示す。

[0094] このDiabody全長をコードする塩基配列を作成するために合計12本の合成オリゴDNAを設計した。これらはセンス配列とアンチセンス配列からなり、長さが79塩基から103塩基にわたる。またアセンブリングによる連結に必要な互いに相補的な配列を含む。この工程を模式的に表したものを図4および5に示す。各合成オリゴDNAの塩基配列を配列番号: 14から配列番号: 25に示す。これら配列番号は以下の反応で用いるオリゴDNAの名称と以下のように対応する:

配列番号: 14; S1、

配列番号: 15; AS1、

配列番号: 16; S2、

配列番号: 17; AS2、

配列番号: 18; S3、

配列番号: 19; AS3、

配列番号: 20; S4、

配列番号: 21; AS4、

配列番号: 22; S5、

配列番号:23;AS5、

配列番号:24;S6、および

配列番号:25;AS6。

[0095] これらの合成オリゴDNAについて、まず、3段階からなるアセンブリングを行った。アセンブリングの条件は以下のとおりである。第1段階アセンブリングは次の6本のチューブで反応を行った:

- 1)チューブA:合成DNA S1およびAS1、
- 2)チューブB:合成DNA S2およびAS2、
- 3)チューブC:合成DNA S3およびAS3、
- 4)チューブD:合成DNA S4およびAS4、
- 5)チューブE:合成DNA S5およびAS5、並びに
- 6)チューブF:合成DNA S6およびAS6。

各チューブに、各合成DNAは40 pmolずつ添加し、それぞれにdATP、dGTP、dTTP、dCTP各々を250 μ M含むdNTP mix、1 \times TaKaRa pyrobsetTM DNA Polymeraseバッファー、および1.25ユニットのTaKaRa pyrobsetTM DNA Polymeraseを含む25 μ Lの反応溶液を調製した。各チューブをサーマルサイクラーGene Amp PCR System 2400 (PERKIN ELMER) (以下のすべての反応においてこのサーマルサイクラーを使用) にセットした。94 $^{\circ}$ Cにて1分の変性の後、94 $^{\circ}$ C、30秒;72 $^{\circ}$ C、30秒からなるサイクルを5サイクル行った。第2段階アセンブリングはチューブを4本準備した:

- 1)チューブ1:チューブAおよびBの反応産物、
- 2)チューブ2:チューブBおよびCの反応産物、
- 3)チューブ3:チューブDおよびEの反応産物、並びに
- 4)チューブ4:チューブEおよびFの反応産物。

各チューブにおいて、各反応産物を10 μ Lずつ混合し、サーマルサイクラーで94 $^{\circ}$ Cにて1分間の変性を行った後、94 $^{\circ}$ C、30秒;72 $^{\circ}$ C、30秒からなるサイクルを5サイクル行った。第3段階アセンブリングはチューブを2本準備した:

- 1)チューブ1+2:チューブ1および2の反応産物、並びに
- 2)チューブ3+4:チューブ3および4の反応産物。

各チューブにおいて各反応産物を20 μ Lずつ混合し、サーマルサイクラーで94℃にて1分間の変性を行った後、94℃、30秒;72℃、30秒からなるサイクルを5サイクル行った。

[0096] 上記3段階のアセンブリングに続いてPCRを行った。このPCRではチューブを2本準備した。1本目のチューブ(チューブH)は、チューブ1+2の反応産物を1 μ L、各40 pmolの外部プライマーKMTR1 H1(配列番号:26)およびKMTR1 H2(配列番号:27)、dATP、dGTP、dTTP、dCTP各々を250 μ M含むdNTP mix、1×TaKaRa pyrobset™ DNA Polymeraseバッファー、並びに2.5ユニットのTaKaRa pyrobset™ DNA Polymeraseを含む50 μ Lの反応溶液を含む。もう一方のチューブ(チューブL)は、チューブ3+4の反応産物を1 μ L、各40 pmolの外部プライマーKMTR1 L1(配列番号:28)およびKMTR1 L2(配列番号:29)、dATP、dGTP、dTTP、dCTP各々を250 μ M含むdNTP mix、1×TaKaRa pyrobset™ DNA Polymeraseバッファー、並びに2.5ユニットのTaKaRa pyrobset™ DNA Polymeraseを含む50 μ Lの反応溶液を含む。チューブHおよびLをサーマルサイクラーで94℃にて1分間の変性に付した後、94℃、30秒;72℃、30秒からなるサイクルを30サイクル行った。

[0097] 上記PCRで得た産物は、さらに、それぞれ以下のようにアセンブリングおよびPCRによる増幅を行った。まず、1本のチューブKにおいてチューブHおよびLで得た産物を各2.5 μ Lずつ添加し、dATP、dGTP、dTTP、dCTP各々を250 μ M含むdNTP mix、1×TaKaRa pyrobset™ DNA Polymeraseバッファー、および2.5ユニットのTaKaRa pyrobset™ DNA Polymeraseを含む50 μ Lの反応溶液を調製した。これをサーマルサイクラーで94℃にて1分の変性の後、94℃、30秒;72℃、30秒からなるサイクルを5サイクル行った。次にチューブK-2中に、チューブKで得た反応産物1 μ Lに40 pmolずつの外部プライマーKMTR1 H1(配列番号:26)およびKMTR1 L2(配列番号:29)、dATP、dGTP、dTTP、dCTP各々を250 μ M含むdNTP mix、1×TaKaRa pyrobset™ DNA Polymeraseバッファー、並びに5ユニットのTaKaRa pyrobset™ DNA Polymeraseを含む50 μ Lの反応溶液を調製した。これをサーマルサイクラーで94℃にて1分の変性の後、94℃、30秒;72℃、60秒からなるサイクルを30サイクル行った。反応産物を1.2%アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ800 bpの断片をゲルから切り

出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。次に断片を制限酵素 EcoRI および NotI で消化後、QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN) で精製した。こうして得た断片を予め制限酵素 EcoRI および NotI で開裂した発現ベクター pCXND3 に挿入し、塩基配列を決定した。目的の配列をもつプラスミドを pCXND3/KMTR1#33 と命名した。

[0098] 1-2. Triabody 発現ベクターの構築

scFv の構造において、リンカーの長さを適切にデザインすれば、scFv は 3 量体を形成し、これが 3 価の抗原結合部位を形成する Triabody として機能しうることが文献的に報告されている (J. Immunol. Methods (1999) 231: 177-89)。これを参考に、ここではリンカーアミノ酸 Gly の個数を 2、1 または 0 個の 3 種類で構築し、各リンカーを持つ Triabody を評価した。各 Triabody を構成する scFv を ScFvH2L、ScFvH1L、および ScFvH0L と命名した。各 Triabody を製造するための発現ベクターを以下のように構築した。

[0099] 1-2-1. ScFvH2L の構築

Diabody 発現ベクター pCXND3/KMTR1#33 のリンカー部分 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser / 配列番号: 10) を含む領域を挟むように該ベクターにハイブリダイズし、かつこれらのプライマーを用いて増幅された断片中のリンカーが Gly-Gly の 2 mer になるようなプライマー ScFv-2S (配列番号: 30) および ScFv-2A (配列番号: 31) を設計した。設計に際しては、pCXND3/KMTR1#33 を鋳型として、KMTR1 H1 (配列番号: 26) と ScFv-2A との組み合わせ、及び、ScFv-2S と KMTR1 L2 (配列番号: 29) とでそれぞれ PCR を行って得られる 2 つの断片が、互いの相補性によってアセンブルできるよう 18 塩基の重なりを互いに持たせるようなデザインとした。

[0100] チューブ 2-1 では、各 50 pmol のプライマー KMTR1 H1 および ScFv2A を次の反応溶液 (以下 1-2.、1-3-2. および 1-4-2. の項目では PCR 反応溶液と呼ぶ) に添加した: 鋳型として 100 ng の pCXND3/KMTR1#33、dATP、dGTP、dTTP、dCTP 各々を 250 μ M 含む dNTP mix、1 \times TaKaRa pyrobsetTM DNA Polymerase バッファー、および 5 ユニットの TaKaRa pyrobsetTM DNA Polymerase を含む最終容量 50 μ L の反応溶液。この PCR 反応溶液を含むチューブ 2-1 をサーマルサイクラーで 94 $^{\circ}$ C にて 1 分の変性した後、94

℃、30秒;72℃、60秒からなるサイクルを30サイクル行った。反応産物を1.2%アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ400 bpの断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。

[0101] チューブ2-2では各50 pmolのプライマーScFv2SおよびKMTR1 L2をPCR反応溶液に添加し、総量50 μ Lとなるよう調製した。チューブ2-1と同様にして、チューブ2-2の反応溶液についてもPCRを行い、目的サイズ400 bpの断片を精製した。

[0102] チューブ2-1およびチューブ2-2のそれぞれの反応産物から得た増幅DNA断片は以下の手順によりアセンブルおよび増幅を行った。

チューブ2-1およびチューブ2-2から得たDNA断片を1 μ Lずつ以下の反応溶液(以下1-2.の項目中、アセンブル溶液と呼ぶ)に添加した:dATP、dGTP、dTTP、dCTP各々を250 μ M含むdNTP mix、1 \times TaKaRa pyrobset™ DNA Polymeraseバッファー、および5ユニットのTaKaRa pyrobset™ DNA Polymeraseを含む最終容量50 μ Lの反応溶液。この溶液を含むチューブ2をサーマルサイクラーで94℃にて1分変性した後、94℃、30秒;72℃、60秒からなるサイクルを5サイクル行いアセンブルした。さらに反応溶液に、各0.5 μ Lの100 μ MのKMTR1 H1およびKMTR1 L2を添加し、94℃で1分の変性した後、94℃、60秒;72℃、60秒からなるサイクルを30サイクル行い増幅を行った。反応産物は1.2%アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ800 bpの断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。精製した断片は制限酵素EcoRIおよびNotIで消化し、予め制限酵素EcoRIおよびNotIで開裂した発現ベクターpCXND3に挿入し、断片の塩基配列を決定した。目的の配列をもつプラスミドをpCXND3/KMTR1ScFv2と命名した。

[0103] 1-2-2. ScFvH1Lの構築

プライマーScFv-1S(配列番号:32)およびScFv-1A(配列番号:33)を、Diabody発現ベクターpCXND3/KMTR1#33のリンカー部分(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser/配列番号:10)を含む領域を挟むようにハイブリダイズし、かつこれらのプライマーを用いて増幅された断片のリンカー部分がGlyとなるよう設計した。pCXND3/KMTR1#33を鋳型として、KMTR1 H1(配列番号:26)とScFv-1A、及びScFv-1SとKMTR1 L2(配列番号:29)の2組のプライマーの組合わせそれぞれでPCRを行って得られる断片同士が、互

いの相補性によるアセンブルを可能にする18塩基の重なりを持つように、プライマーをデザインした。

- [0104] チューブ1-1では、各50 pmolのプライマーKMTR1 H1およびScFv1AをPCR反応溶液に添加し、サーマルサイクラーで94℃にて1分変性させた後、94℃、30秒;72℃、60秒からなるサイクルを30サイクル行った。反応産物は1.2%アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ400 bpの断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。
- [0105] チューブ1-2では、各50 pmolのプライマーScFv1SおよびKMTR1 L2をPCR反応溶液に添加し、総量50 μ Lとなるよう調製した。チューブ1-1と同様に、チューブ1-2についてもPCRを行い、目的サイズ400 bpの断片を精製した。
- [0106] チューブ1-1およびチューブ1-2のそれぞれの反応産物から得た増幅DNA断片を次のようにアセンブルおよび増幅した:チューブ1-1およびチューブ1-2から得たDNA断片を1 μ Lずつアセンブル溶液に添加した。この混合反応溶液を含むチューブ1をサーマルサイクラーで94℃にて1分間の変性に付した後、94℃、30秒;72℃、60秒からなるサイクルを5サイクル行いアセンブルした。このチューブに、さらに各0.5 μ Lの100 μ MのKMTR1 H1およびKMTR1 L2を添加し、94℃、1分間の変性を行い、続いて94℃、60秒;72℃、60秒からなるサイクルを30サイクル行い増幅を行った。反応産物は1.2%アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ800 bpの断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。精製した断片を制限酵素EcoRIおよびNotIで消化し、予め制限酵素EcoRIおよびNotIで開裂した発現ベクターpCXND3に挿入し、断片の塩基配列を決定した。目的の配列をもつプラスミドをpCXND3/KMTR1ScFv1と命名した。
- [0107] 1-2-3. ScFvH0Lの構築
- プライマーScFv-0S (配列番号:34) およびScFv-0A (配列番号:35) を、Diabody発現ベクターpCXND3/KMTR1#33のリンカー部分 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser/配列番号:10) を含む領域を挟むようにハイブリダイズし、かつこれらのプライマーを用いて増幅された断片にはリンカーが含まれないよう設計した。pCXND3/KMTR1#33を鋳型として、KMTR1 H1 (配列番号:26) とScFv-0、及びScFv-0SとKMTR1 L2 (配列番号:29

)との各プライマーの組合わせでPCRを行った場合に得られる2つの断片同士が、互いの相補性によってアセンブルできるような18塩基の重なりをそれぞれ持つように、各プライマーをデザインした。

[0108] チューブ0-1では、各50 pmolのプライマーKMTR1 H1およびScFv0AをPCR反応溶液に添加し、サーマルサイクラーで94℃、1分の変性を行った後、94℃、30秒;72℃、60秒からなるサイクルを30サイクル行った。反応産物は1.2%アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ400 bpの断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)で精製した。

[0109] チューブ0-2では、各50 pmolのプライマーScFv0SおよびKMTR1 L2をPCR反応溶液に添加し、総量50 μ Lとなるよう調製した。チューブ0-1と同様に、チューブ0-2についてもPCRを行い、目的サイズ400 bpの断片を精製した。

[0110] チューブ0-1およびチューブ0-2のそれぞれの反応産物から得た増幅DNA断片を次のようにアセンブルおよび増幅した:チューブ0中のアセンブル溶液に、チューブ0-1およびチューブ0-2から得たDNA断片を1 μ Lずつ添加した。この混合反応溶液をサーマルサイクラーで94℃にて1分変性させた後、94℃、30秒;72℃、60秒からなるサイクルを5サイクル行いアセンブルを行った。これに100 μ MのKMTR1 H1およびKMTR1 L2を0.5 μ Lずつ添加し、94℃で1分の変性した後、94℃、60秒;72℃、60秒からなるサイクルを30サイクル行い増幅を行った。反応産物は1.2%アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ800 bpの断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)で精製した。精製した断片を制限酵素EcoRIおよびNotIで消化し、予め制限酵素EcoRIおよびNotIで開裂した発現ベクターpCXND3に挿入し、断片の塩基配列を決定した。目的の配列をもつプラスミドをpCXND3/KMTR1ScFv0と命名した。

[0111] 1-3. Tandem Diabody発現ベクターの構築

1-3-1. Tandem Diabodyのデザイン

重鎖可変領域(VH)と軽鎖可変領域(VL)とを2つずつVH-VL-VH-VLの順でタンデムに連結したsc(Fv)2において、その可変領域間のリンカーを適切にデザインすればタンパクとして発現させた場合、2つのsc(Fv)2分子の間に組みになったVH-VLが互

いに会合し、合計4つの抗原結合部位を持つTandem Diabodyを形成できることが報告されている(Cancer Research (2000) 60: 4336-41)。

ここでは、sc(Fv)2の可変領域間の3つのリンカーが、5 mer、12 mer及び5 merの順に構成されるsc(Fv)2をデザインした。具体的には、12 merのリンカー配列として、上記報告に記載のSL配列(Arg-Ala-Asp-Ala-Ala-Ala-Gly-Gly-Pro-Gly-Ser/配列番号:36)を採用し、5 merのリンカーとしてGly-Gly-Gly-Gly-Ser(配列番号:10)を採用した。構築したベクターにコードされるアミノ酸配列はアミノ末端から順に(VHシグナル配列)-(VH)-(5 merリンカー)-(VL)-(12 merリンカー)-(VH)-(5 merリンカー)-(VL)-(Flagタグ)-(終止コドン)である。

[0112] このようなsc(Fv)2をコードするDNA断片を得るために、1-1.で作製したDiabody発現ベクターpCXND3/KMTR1#33を鋳型としたPCRを行った。PCRにより、(VHシグナル配列)-(VH)-(5 merリンカー)-(VL)-(12 merリンカーの一部)をコードするDNA断片フラグメント1、及び、(12 merリンカーの一部)-(VH)-(5 merリンカー)-(VL)-(Flagタグ)-(終止コドン)をコードするDNA断片フラグメント2を得た。これら2つのフラグメントを12 merのリンカー内に存在するSmaI制限酵素認識配列を利用して連結することによりsc(Fv)2をコードするDNA断片を構築した。

[0113] 1-3-2. Tandem Diabodyの構築

プライマーKMTR1tanA(配列番号:37)は、Diabody発現ベクターpCXND3/KMTR1#33のVHの末端にハイブリダイズする配列に続くSmaI認識配列を含む12 merのリンカー配列をコードする配列からなるアンチセンス配列を持つ。プライマーKMTR1tanS(配列番号:38)はSmaI認識配列を含む12 merのリンカー配列をコードする配列に続くDiabody発現ベクターpCXND3/KMTR1#33のVLの末端にハイブリダイズする配列からなるセンス配列を持つ。これらのプライマーを用いてフラグメント1および2を増幅した。

[0114] チューブ#1では、各50 pmolのプライマーKMTR1 H1(配列番号:26)およびKMTR1tanAを、pCXND3/KMTR1#33を鋳型として含むPCR反応溶液(1-2.に記載)に添加し、サーマルサイクラーで94℃にて1分の変性、94℃、30秒;72℃、60秒からなるサイクルを30サイクル行った。反応産物は1%アガロースゲル電気泳動で分離し、目

的のサイズ800 bpの断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。これを制限酵素EcoRIおよびSmaIにより消化し、予め制限酵素EcoRIおよびSmaIで開裂したベクターpBluescript^(R) II (TOYOBO) に挿入し、断片の塩基配列を決定した。目的の配列をもつプラスミドをpBS/KMTR1tanFr1と命名した。

[0115] チューブ#2では、各50 pmolのプライマーKMTR1 L2(配列番号:29)およびKMTR1tanSをpCXND3/KMTR1#33を鋳型として含むPCR反応溶液(1-2. に記載)に添加し、サーマルサイクラーで94℃にて1分の変性、94℃、30秒;72℃、60秒からなるサイクルを30サイクル行った。反応産物は1%アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ800 bpの断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。これを制限酵素SmaIおよびNotIにより消化し、予め制限酵素SmaIおよびNotIで開裂したベクターpBluescript^(R) IIに挿入し、断片の塩基配列を決定した。目的の配列をもつプラスミドをpBS/KMTR1tanFr2と命名した。

[0116] 次に、pBS/KMTR1tanFr1は制限酵素EcoRIおよびSmaIで、またpBS/KMTR1tanFr2は制限酵素SmaIおよびNotIでそれぞれ消化し、反応産物を1%アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ800 bpの各断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。これらの各断片を予め制限酵素EcoRIおよびNotIで開裂した発現ベクターpCXND3に挿入し、目的の長さの断片をもつプラスミドをpCXND3/KMTR1 Tandabと命名した。

[0117] 1-4. Whole IgG発現ベクターの構築

1-4-1. Whole IgG発現ベクターのデザイン

既に特許(WO 92/19759)で報告されているように、発現ベクターHEF-PMh-g γ 1にシグナル配列およびVHからなる断片を挿入すると、ヒトEF1 α プロモーターの制御下で、該VH断片にヒトH鎖定常領域が付加されたWhole IgGのH鎖を発現する。同様に、発現ベクターHEF-PM1k-g κ は、シグナル配列およびVLとからなる断片の挿入により、ヒトEF1 α プロモーターの制御下で、該VL断片にヒトL鎖定常領域が付加されたWhole IgGのL鎖を発現する。これらH鎖およびL鎖の発現ベクターを動物細胞COS-7等に共導入すればWhole IgGを発現させることができる。

[0118] H鎖発現ベクターの構築は、以下のようにして行うことができる。Diabody発現ベクタ

一pCXND3/KMTR1#33には、シグナル配列およびVHをコードする配列が一続きのDNAとして挿入されている。そこで、発現ベクターHEF-PMh-g γ 1にこのシグナル配列およびVHコードDNAを組み換えるには、最初に、pCXND3/KMTR1#33を鋳型とし、適切なプライマーを用いて、PCR法により対応する配列部分を増幅する必要がある。次に、増幅された配列を必要に応じ制限酵素等で処理した後に、適切な処理をした発現ベクターHEF-PMh-g γ 1に挿入すればよい。

- [0119] また、L鎖発現ベクターの構築は次のようにして行うことができる。Diabody発現ベクターpCXND3/KMTR1#33には、VLが挿入されているがそのシグナル配列は含まれていない。そこで、特許(WO 02/094880 A1)に記載されているKMTR1抗体L鎖シグナル配列に相当する塩基配列をVLに付加することができるセンスプライマーを設計・合成し、適切なアンチセンスプライマーとを組合わせてpCXND3/KMTR1#33を鋳型としたPCRを行うことでシグナル配列を持つVLを増幅することができる。このようにして増幅された断片を必要に応じ制限酵素により処理した後、適切な処理をした発現ベクターHEF-PM1k-g κ に挿入することによりL鎖発現ベクターを構築することができる。

[0120] 1-4-2. Whole IgG発現ベクターの構築

センスプライマーKMTRVHsp(配列番号:39)をpCXND3/KMTR1#33のコード配列中、アミノ末端にハイブリダイズするよう設計した。KMTRVHspには、クローニングのためにHindIII制限酵素認識配列が付加されている。アンチセンスプライマーKMTRVHap(配列番号:40)はpCXND3/KMTR1#33のコード配列中、カルボキシ末端にハイブリダイズし、カルボキシ末端の直後にスプライドナー配列を持つよう設計した。KMTRVHapには、クローニングのためにBamHI制限酵素認識配列が付加されている。センスプライマーKMTRVLsp(配列番号:41)は、特許(WO 02/094880)に記載のKMTR1 VLのシグナル配列をコードする配列を含み、その上流にKozakコンセンサス配列CCACCおよびBamHI制限酵素認識配列を持つよう設計した。KMTRVLspは、pCXND3/KMTR1#33のコード配列中、VLのアミノ末端にハイブリダイズするよう設計した。さらに、クローニングのためにHindIII制限酵素認識配列が付加されている。アンチセンスプライマーKMTRVLap(配列番号:42)はpCXND3/KMTR1#33のコー

ド配列中、VLのカルボキシ末端にハイブリダイズし、カルボキシ末端の直後にスプライドナー配列を持つよう設計した。KMTRVLapは、クローニングのためにBamHI制限酵素認識配列が付加されている。

[0121] チューブVHでは、各50 pmolのプライマーKMTRVHspおよびKMTRVHapをpCXND3/KMTR1#33を鋳型として含むPCR反応溶液(1-2. に記載)に添加し、サーマルサイクラーで94℃にて1分の変性を行った後、94℃、30秒;72℃、60秒からなるサイクルを30サイクル行った。反応産物は1%アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ400 bpの断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)で精製した。これを制限酵素BamHIおよびHindIIIにより消化し、予め制限酵素BamHIおよびHindIIIで開裂した発現ベクターHEF-PMh-g γ 1に挿入し、断片の塩基配列を決定した。目的の配列をもつプラスミドをpHEF-KMTR1VH-g γ 1と命名した。

[0122] チューブVLでは、各50 pmolのプライマーKMTRVLspおよびKMTRVLapをpCXND3/KMTR1#33を鋳型として含むPCR反応溶液(1-2. に記載)に添加し、サーマルサイクラーで94℃にて1分の変性を行った後、94℃、30秒;72℃、60秒からなるサイクルを30サイクル行った。反応産物は1%アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ400 bpの断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)で精製した。これを制限酵素BamHIおよびHindIIIにより消化し、予め制限酵素BamHIおよびHindIIIで開裂した発現ベクターHEF-PM1k-g κ に挿入し、断片の塩基配列を決定した。目的の配列をもつプラスミドをpHEF-KMTR1VL-g κ と命名した。

[0123] 2. Diabody、Triabody、Tandem diabodyおよびWhole IgGの発現

1.において構築した各発現ベクター各10 μ gずつを、Gene Pulser装置を用いたエレクトロポレーション法によりCOS-7細胞に導入した。すなわち、各DNA(10 μ g)をPBS中に懸濁した 1×10^7 細胞の0.8 mLのアリコートに加え、1500 V、25 μ Fの用量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%ウシ胎児血清(GIBCO BRL)を含むDMEM培地(GIBCO BRL)30 mLに播種した。これを37℃、5%CO₂の条件下で終夜培養した後、培地除去後、PBSにて細胞を4回洗浄し、CHO-S-SFMII培地(GIBCO BRL)15 mLを添加した。これを37℃、5%CO₂の条件下で72時間培養し、遠心分離により細胞破砕物を除去した上清

を得、さらに0.45 μ mのフィルターで処理して得たものを培養上清として細胞傷害活性の測定に用いた。

[0124] 3. 発現産物の濃度測定

3-1. Diabody、TriabodyおよびTandem Diabodyの濃度測定

2. で発現させた培養上清中のDiabody、Triabodyおよび Tandem Diabodyの濃度は、表面プラズモン共鳴を利用したバイオセンサーBIAcore2000 (BIACORE)を用いて濃度測定した。これらの抗体にはFlagタグが付加されていた。そこで、抗Flag抗体M2 (Sigma)を利用して解析を行った。より具体的には、該抗体をセンサーチップCM5 (BIACORE)にアミンカップリング法で固相化し、このセンサーチップを用いた培養上清の解析により表面プラズモン共鳴シグナルを測定した。

[0125] 3-2. Whole IgGの濃度測定

2.で発現させた培養上清中のIgG濃度測定はELISAで行った。ELISA用96穴プレートMaxisorp (NUNC)の各穴にコーティングバッファー(0.1 M NaHCO_3 、0.02% NaN_3 、pH9.6)により1 μ g/mLの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体(BIOSOURCE)100 μ Lを加え、室温で1時間のインキュベーションを行い固相化した。100 μ Lの希釈バッファー(50 mM Tris-HCl、1mM MgCl_2 、0.15 M NaCl、0.05% Tween20、0.02% NaN_3 、1% ウシ血清アルブミン(BSA)、pH8.1)でブロッキングした後、Whole IgGを発現させた培養上清を順次段階希釈して各穴に100 μ Lずつ加え、室温で1時間のインキュベーションした。各穴を洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG (BIOSOURCE)100 μ Lを加えた。室温にて1時間のインキュベーションを行い、洗浄した後、基質バッファー(50 mM NaHCO_3 、10 mM MgCl_2 、pH9.8)に溶解した1 mg/mLの基質溶液(Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、Sigma)100 μ Lを加え、405 nmでの吸光度をMICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad)を用いて測定した。濃度測定の標準品としてヒトIgG1 κ (The Binding Site)を用いた。

[0126] 4. 細胞傷害活性の評価

2. で発現させた培養上清中のDiabody、Triabodyおよび Tandem Diabodyの生物活性は細胞傷害活性で評価した。具体的には、実際にTRAIL受容体の発現が認められている大腸癌細胞株COLO 205(ATCC CCL-222)を細胞培養用96穴マイクロ

プレート(FALCON)に 7.5×10^4 細胞/ウェルで播種し、CHO-S-SFMII(GIBCO BRL)で順次段階希釈した各培養上清を各穴に添加した。必要に応じてクロスリンカーとして抗Flag抗体M2(Sigma)を $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度で添加した。細胞傷害活性評価の陽性対照にはTRAIL天然リガンドApo2L組み換え体(Sigma)をCHO-S-SFMIIで希釈して用いた。こうして調製したマイクロプレートは 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件で終夜培養し、翌日に細胞増殖/細胞毒性測定試薬Cell Counting Kit-8(WAKO)を添加して発色させた後、 450 nm での吸光度をMicroplate Spectrophotometer Benchmark PlusTM(Bio-Rad)で測定した。

[0127] Diabodyの細胞傷害活性評価の結果を図1に示す。この結果、Diabodyのみを添加した細胞の減少は観察されず、Diabody単独では細胞傷害活性が認められなかった。ところが、DiabodyにM2抗体を添加し、Diabodyをクロスリンクすると顕著な細胞傷害活性が認められた。このことから、細胞膜表面上でのTRAIL受容体の重合を促進することでアポトーシスシグナルが効率よく伝達されることが示唆された。そこで、単独の分子としてより活性の高い形態を探索した。

[0128] TriabodyおよびWhole IgGの細胞傷害活性評価の結果を図2に示す。この結果、DiabodyおよびWhole IgGには顕著な細胞傷害活性が認められなかった。それに対し、Triabodyを添加した細胞は劇的に減少し、Triabodyには明らかな細胞傷害活性が検出された。とりわけ、リンカー長が1 merおよび0 merのTriabodyの活性が顕著であった。本実験ではWhole IgG(IgG1/ κ)には細胞傷害活性が認められなかった。この結果は、特許(WO 02/094880 A1)では同じ抗体がIgG1の形態でCOLO 205細胞に対して半数殺傷濃度LD50=100 ng/mLを示すことと一致しなかった。そこで本実験で用いたWhole IgGのCOLO 205細胞に対する結合活性をセルソーターで評価した。その結果、mockに比較して十分ヒストグラムのシフトが検出されたことから、Whole IgGは、結合活性を保持しているものと考えられた。

[0129] 次に、TriabodyとTandem Diabodyの細胞傷害活性の比較を行った。結果を図3に示す。この結果、Tandem DiabodyはTriabodyを上回る活性を示し、その活性は、天然リガンドApo2Lと同等かそれ以上であった。これらの結果は、比較した分子のうち、Tandem Diabodyが単独で最も有効な分子であることを示す。

[0130] 以上、単独の分子としてTandem DiabodyおよびTriabodyはWhole IgGを上回る細胞傷害活性を示す分子形態であることが示された。この結果はTRAIL受容体を細胞膜表面上で重合させる場合、その重合程度に応じて細胞死誘導シグナルの活性化の度合いが異なり、重合度が高いほどより細胞死誘導シグナルが活性化されることを示唆する新規な知見である。同様の細胞内シグナル伝達機構で細胞死シグナルを伝達するFas受容体、TNF受容体を含むTNF受容体ファミリーについても一般に、このような現象が予測される。従って、Tandem Diabody及びTriabody等の3つ以上の抗原結合部位を含む抗体は、TRAIL受容体以外のこれらの受容体を介したアポトーシスの誘導にも利用できることが期待される。

産業上の利用可能性

[0131] 抗体を低分子化することにより、より高い比活性、及びより短い血中半減期を持つようにすることができる。そのため、低分子化抗体の投与では有効血中濃度の調節が容易となり、臨床応用上IgG等の全長抗体と比べ有利である。従って、低分子化抗体は、従来のアゴニスト抗体よりも優れた性質の抗癌剤となり得るものと期待される。また、低分子化抗体は、糖鎖が結合していないことから、組み換え型タンパクとして発現させる場合にも、その発現系が制限されない。例えば、哺乳動物由来の細胞株、酵母、昆虫細胞、大腸菌等、多様な発現系により製造することが可能である。また、本発明により、多価、特に3価以上の抗原結合部位を有する低分子化抗体が、TRAIL受容体のような3量体を形成してシグナル伝達を行う受容体に対するアゴニスト抗体として特に有効であることが示された。

請求の範囲

- [1] TNF関連アポトーシス誘導リガンド受容体(TRAIL受容体)を認識する抗体。
- [2] 低分子化抗体である請求項1に記載の抗体。
- [3] 抗原結合部位を3つ以上含むことを特徴とする請求項1及び2に記載の抗体。
- [4] 抗原結合部位が3つである請求項3に記載の抗体。
- [5] 3つのscFvが3量体を形成していることを特徴とする請求項4に記載の抗体。
- [6] scFv中の2つの可変領域が0〜2アミノ酸のリンカーで結合されている請求項5に記載の抗体。
- [7] リンカーが0アミノ酸である請求項6に記載の抗体。
- [8] リンカーが1アミノ酸である請求項6に記載の抗体。
- [9] 抗原結合部位が4つである請求項3に記載の抗体。
- [10] 4つの可変領域を含むポリペプチドが2量体を形成している請求項9に記載の抗体。
- [11] TRAIL受容体がTRAIL-R1又はTRAIL-R2である請求項1〜10のいずれかに記載の抗体。
- [12] 細胞にアポトーシスを誘起することを特徴とする請求項1〜11のいずれかに記載の抗体。
- [13] 細胞が腫瘍細胞である請求項12に記載の抗体。
- [14] 配列番号:2に記載のアミノ酸配列を有する抗体。
- [15] 配列番号:4に記載のアミノ酸配列を有する抗体。
- [16] 配列番号:6に記載のアミノ酸配列を有する抗体。
- [17] 配列番号:8に記載のアミノ酸配列を有する抗体。
- [18] 抗原結合部位を3つ以上含み、細胞にアポトーシスを誘起する抗体。
- [19] 抗原結合部位が3つである請求項18に記載の抗体。
- [20] 抗原結合部位が4つである請求項18に記載の抗体。
- [21] 細胞が腫瘍細胞である請求項18〜20のいずれかに記載の抗体。
- [22] 請求項1〜21のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。
- [23] 請求項22に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、

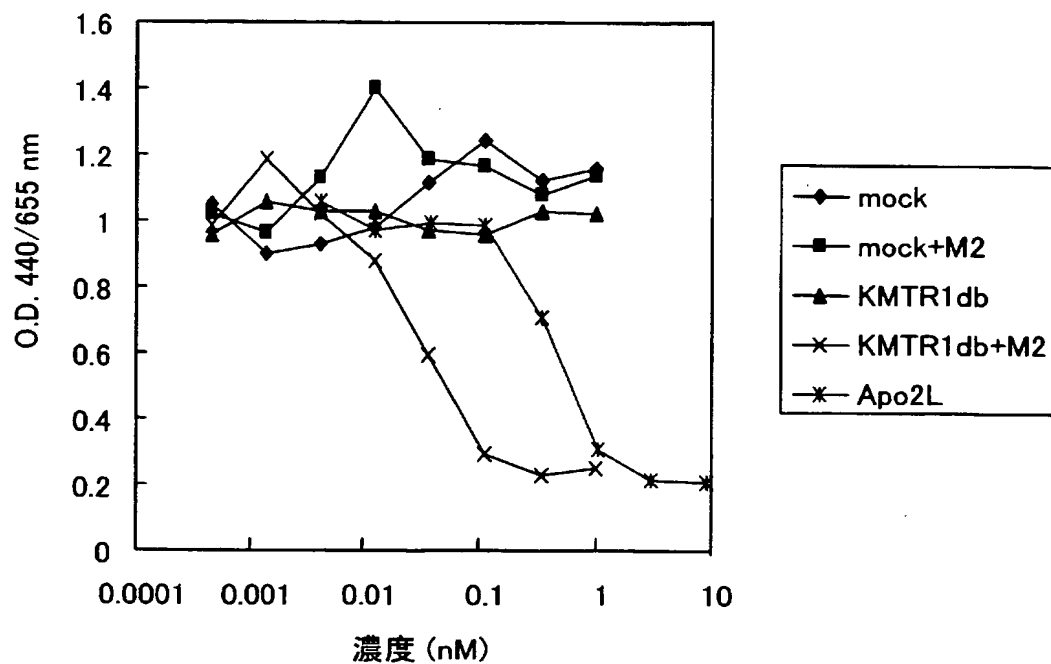
かつ請求項1〜21のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするポリヌクレオチド。

[24] 請求項22または23に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

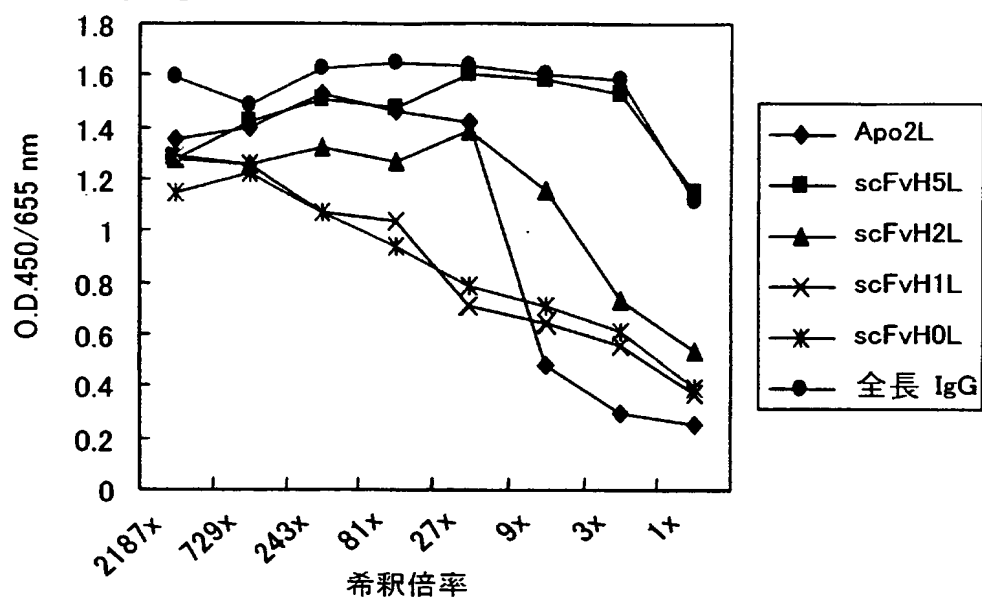
[25] 請求項22または23に記載のポリヌクレオチドまたは請求項24に記載のベクターを保持する宿主細胞。

[26] 請求項1〜21のいずれかに記載の抗体を含有する、医薬組成物。

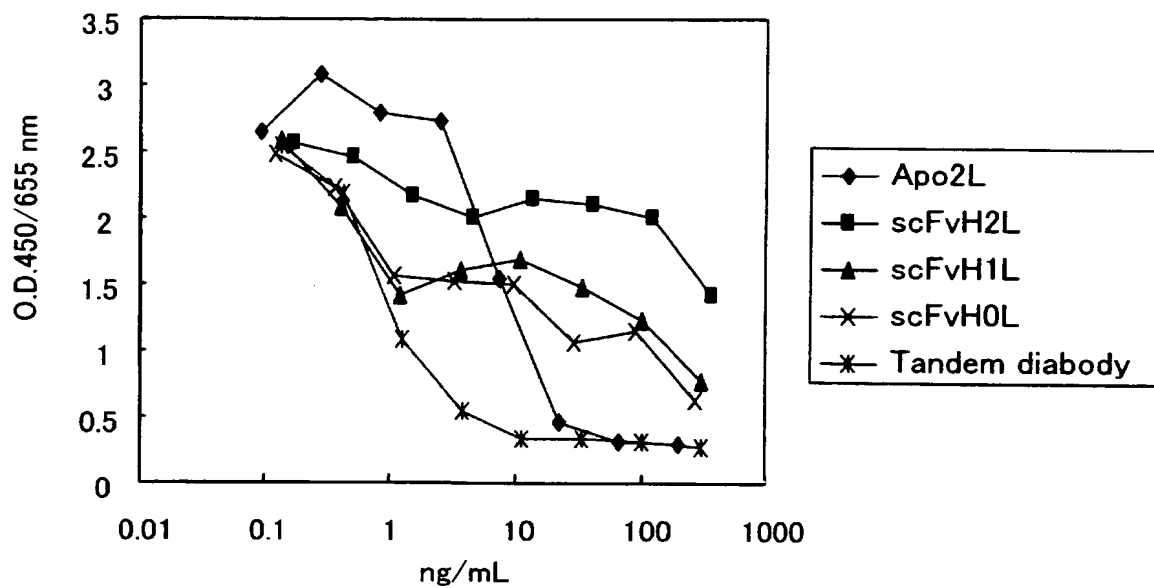
[図1]



[図2]

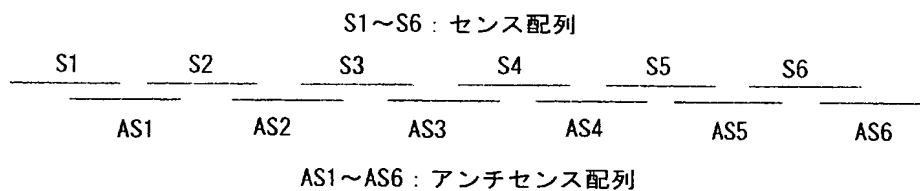


[図3]

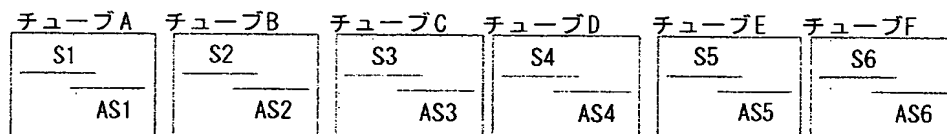


[図4]

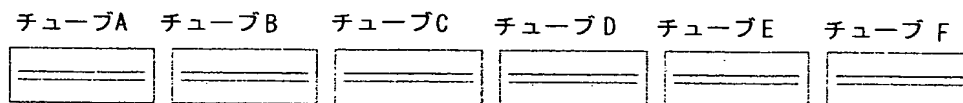
合成オリゴの位置関係



第1段階アセンブリ

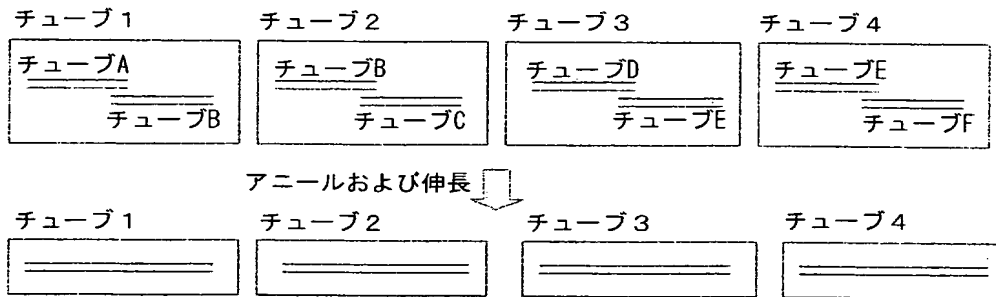


アニールおよび伸長

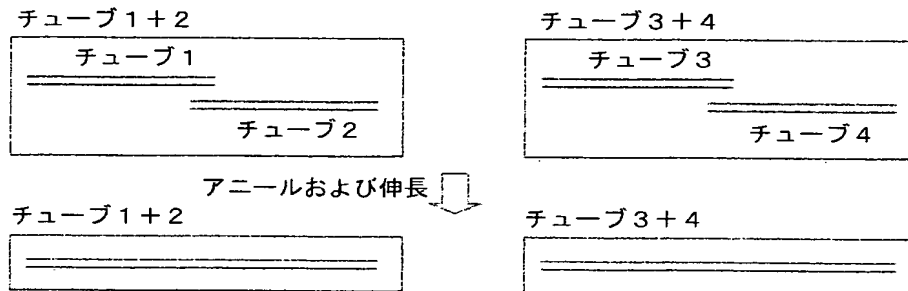


[図5]

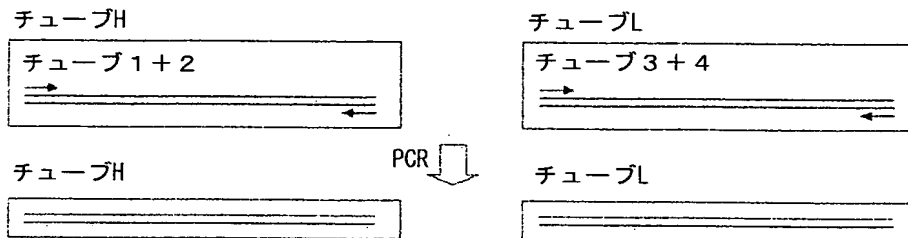
第2段階アセンブリング



第3段階アセンブリング



第3段階アセンブリング後のPCR



最終アセンブリングとPCR

